



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MARIA LUCILEIDE NOGUEIRA SANTOS RAMOS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DA  
FRAÇÃO LÍQUIDA DA PIRÓLISE DE ESTERCO BOVINO:  
FONTE ALTERNATIVA DE FUNGICIDAS.**

***IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITY EVALUATION OF LIQUID  
FRACTION FROM CATTLE MANURE PYROLYSIS:  
ALTERNATIVE SOURCE OF FUNGICIDES.***





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MARIA LUCILEIDE NOGUEIRA SANTOS RAMOS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DA**  
**FRAÇÃO LÍQUIDA DA PIRÓLISE DE ESTERCO BOVINO:**  
**FONTE ALTERNATIVA DE FUNGICIDAS.**

Dissertação de mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química, da Universidade Federal de  
Sergipe, para a obtenção do título de  
Mestre em Química.

**Orientador:** Prof. Dr. Alberto Wisniewski Jr.

***IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITY EVALUATION OF LIQUID***  
***FRACTION FROM CATTLE MANURE PYROLYSIS:***  
***ALTERNATIVE SOURCE OF FUNGICIDES.***

*Master dissertation presented to the  
Graduate Program in Chemistry of the  
Federal University of Sergipe to  
obtain MSc. in Chemistry.*



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

R175a Ramos, Maria Lucileide Nogueira Santos  
Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* da fração líquida da  
pirólise de esterco bovino: fonte alternativa de fungicidas / Maria  
Lucileide Nogueira Santos Ramos ; orientador Alberto Wisniewski  
Jr. - São Cristóvão, 2019.  
141 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de  
Sergipe, 2019.

1. Química. 2. Fusarium solani. 3. Fungos fitopatogênicos. 4.  
Resíduos orgânicos. 5. Fungicidas. 6. Óleos e gorduras. I.  
Wisniewski Jr., Alberto orient. II. Título.

CDU 54:615



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
Programa de Pós-Graduação em Química  
PPGQ



### FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de MARIA LUCILEIDE NOGUEIRA SANTOS RAMOS apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 04/02/2019.

Prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior  
Departamento de Química - UFS

Prof.ª Dr.ª Flaviana Cardoso Damasceno  
Departamento de Química – UFS

Prof. Dr. Paulo Roberto Gagliardi  
Departamento de Engenharia Agrônômica –UFS

SÃO CRISTÓVÃO - SE

Fevereiro, 2019

## RESUMO

Aproximadamente um terço dos alimentos produzidos para consumo humano são perdidos ou desperdiçados, o que representa cerca de 1,3 bilhão de toneladas por ano. Dentre os organismos que causam doenças em plantas, os fungos fitopatogênicos são os mais destrutivos e impõem grandes danos aos sistemas naturais e de produção. Atualmente os fungicidas sintéticos são os principais meios de controle de doenças ocasionadas por fungos, entretanto, o uso contínuo e sistemático de fungicidas pode selecionar fungos com múltiplas resistências. Neste contexto, os fungicidas alternativos emergem como uma ferramenta promissora para controle de doenças em plantas. Inicialmente a conversão térmica de biomassa lignocelulósica surgiu como um processo sustentável para produção de biocombustíveis, entretanto, em função da diversidade de compostos químicos, outros estudos vem sendo realizados visando novas aplicações. Neste trabalho o bio-óleo de esterco bovino produzido a 400, 500 e 600 °C, bem como suas respectivas frações aquosas, tiveram suas atividades antifúngicas avaliadas *in vitro* frente a fungos fitopatogênicos como o *Fusarium solani* e *Lasiodiplodia theobromae*. Os melhores resultados foram observados para a fração aquosa produzida a 400 °C, obtendo na concentração de 4000 µg mL<sup>-1</sup> um potencial fungistático de 100% e potencial fungicida para os fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium solani*. Os bio-óleos produzidos em todas as temperaturas de estudo apresentaram potencial fungistático, porém quando submetidos a análise de variância e caracterização por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS) e Espectrometria de Massas com Transformada de Fourier (FT-MS), não apresentaram diferenças significativas quanto a sua composição, apresentando majoritariamente classe de compostos oxigenados. A caracterização por GC/MS apresentou os compostos fenólicos como principais constituintes dos bio-óleos, sendo que o aumento da temperatura de pirólise proporcionou um aumento relativo da área referente a esses compostos. O processo de extração líquido-líquido foi pouco eficiente para a caracterização das frações aquosas por GC/MS, entretanto, as análises realizadas por FT-MS apontaram diferenças significativas principalmente para a fração produzida a 400 °C, sendo identificadas majoritariamente classes de compostos aromáticos

nitrogenados. Este estudo prévio demonstrou o potencial do uso do bio-óleo e da fração aquosa proveniente da pirólise de esterco bovino como uma fonte alternativa de fungicidas, visando minimizar a poluição ocasionada pela biomassa em estudo, agregando valor aos produtos, ampliando o range de aplicações e minimizando as perdas nas produções de alimentos.

**Palavras Chave:** *Fusarium solani*, *Lasiodiplodia theobromae*, fungicidas alternativos, esterco bovino, bio-óleo, fração aquosa.

## ABSTRACT

About one third of food for human consumption is lost or wasted, representing around 1 billion tons per year. Among the organisms that cause diseases in plants, phytopathogenic fungi are the most destructive and impose huge damage to natural systems and production. Currently synthetic fungicides are the main means of controlling diseases caused by fungi, however, the continuous and systematic use of fungicides may select fungi with multiple resistance. In this context, alternative fungicides emerge as a promising tool for disease control in plants and the thermal conversion of lignocellulosic biomass can contribute to this field. In this work, the bio-oil of cattle manure produced at 400, 500 and 600 °C, as well as their respective aqueous fractions, had their antifungal activities evaluated *in vitro* against phytopathogenic fungi as *Fusarium solani* and *Lasiodiplodia theobromae*. The best activities were observed for the aqueous fraction produced at 400 °C, obtaining a fungistatic potential of 100% at the concentration of 4000 µg mL<sup>-1</sup> as well as a potential fungicide for the fungi *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani*. The bio-oils produced at all studied temperatures had presented fungistatic potential, but when subjected to analysis of variance and characterization by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) and Mass Spectrometry with Fourier Transform (FT-MS) did not present significant differences as to its composition, presenting mainly oxygenated class of compounds. The characterization by GC/MS presented the phenolic compounds as main constituents of the bio-oils, and the increase of the pyrolysis temperature provided a relative increase of the relative area of these compounds peaks. This previous study demonstrated the potential of the use of bio-oil and the aqueous fraction derived from the thermal conversion of cattle manure as an alternative source of fungicides, aiming to minimize the pollution caused by the proposed biomass, adding value to the products, expanding the range of applications and minimizing losses in food production.

**Keywords:** *Fusarium solani*, *Lasiodiplodia theobromae*, alternative fungicides, cattle manure, bio-oil, aqueous fraction.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Perspectiva de crescimento populacional no mundo nas próximas décadas. ....	1
<b>Figura 2.</b> Distribuição global de desperdício de alimentos e perda de alimentos (milhões de toneladas). ....	2
<b>Figura 3.</b> Celulose, hemicelulose e lignina em células vegetais. ....	13
<b>Figura 4.</b> Estrutura da celulose. ....	14
<b>Figura 5.</b> Estrutura das unidades constituintes da hemicelulose. ....	15
<b>Figura 6.</b> Unidades básicas de polímero de lignina. ....	16
<b>Figura 7.</b> Estruturas de ligação da lignina. ....	16
<b>Figura 8.</b> Produção, consumo e exportações de carne bovina no Brasil. ....	18
<b>Figura 9.</b> Consumo per capita de produtos lácteos no Brasil. ....	19
<b>Figura 10.</b> Distribuição de abate de bovinos por estado. ....	20
<b>Figura 11.</b> Distribuição das classes dos compostos tentativamente identificados para os bio-óleos do esterco bovino. ....	21
<b>Figura 12.</b> Distribuição das áreas percentuais dos compostos majoritários tentativamente identificados nas amostras de bio-óleo obtido a 500 °C. ....	22
<b>Figura 13.</b> Forno rotativo, modelo FRO 1100. ....	27
<b>Figura 14.</b> A imagem (A) corresponde ao bio-óleo e a figura (B) a fração aquosa. ....	36
<b>Figura 15.</b> Controle de crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> e interferência do DMSO variando a concentração de 1 a 5%. ....	40
<b>Figura 16.</b> Controle de crescimento do fungo <i>Fusarium solani</i> e interferência do DMSO variando a concentração de 1 a 5%. ....	40
<b>Figura 17.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente ao bio-óleo produzido a 400 °C. ....	42
<b>Figura 18.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente ao bio-óleo produzido a 500 °C. ....	43
<b>Figura 19.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente ao bio-óleo produzido a 600 °C. ....	44
<b>Figura 20.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Fusarium solani</i> frente ao bio-óleo produzido a 400 °C. ....	45



<b>Figura 21.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Fusarium solani</i> frente ao bio-óleo produzido a 500 °C.....	45
<b>Figura 22.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Fusarium solani</i> frente ao bio-óleo produzido a 600 °C.....	46
<b>Figura 23.</b> Controle de crescimento dos fungos <i>Lasiodiplodia theobromae</i> e <i>Fusarium solani</i> .....	47
<b>Figura 24.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente ao bio-óleo produzido a 400 °C. ....	48
<b>Figura 25.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente ao bio-óleo produzido a 500 °C. ....	49
<b>Figura 26.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente ao bio-óleo produzido a 600 °C. ....	49
<b>Figura 27.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Fusarium solani</i> frente ao bio-óleo produzido a 400 °C.....	50
<b>Figura 28.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Fusarium solani</i> frente ao bio-óleo produzido a 500 °C.....	51
<b>Figura 29.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Fusarium solani</i> frente ao bio-óleo produzido a 600 °C.....	51
<b>Figura 30.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente a fração aquosa produzida a 400 °C. ....	53
<b>Figura 31.</b> Estruturas dos compostos encontrados no extrato hexânico .....	54
<b>Figura 32.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente a fração aquosa produzida a 500 °C. ....	54
<b>Figura 33.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente a fração aquosa produzida a 600 °C. ....	55
<b>Figura 34.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Fusarium solani</i> frente a fração aquosa produzida a 400 °C.....	56
<b>Figura 35.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Fusarium solani</i> frente a fração aquosa produzida a 500 °C.....	57
<b>Figura 36.</b> Avaliação do crescimento do fungo <i>Fusarium solani</i> frente a fração aquosa produzida a 600 °C.....	57
<b>Figura 37.</b> Regressão linear e IC <sub>50</sub> para os bio-óleos frente aos fungos <i>Lasiodiplodia theobromae</i> e <i>Fusarium solani</i> . ....	62

<b>Figura 38.</b> Regressão linear e IC <sub>50</sub> para as frações aquosas frentes aos fungos <i>Lasiodiplodia theobromae</i> e <i>Fusarium solani</i> . ....	63
<b>Figura 39.</b> Espectro FTIR dos bio-óleo de esterco bovino. ....	67
<b>Figura 40.</b> TICC dos bio-óleos de esterco bovino. ....	69
<b>Figura 41.</b> TICC dos padrões fenólicos. ....	70
<b>Figura 42.</b> Classes dos compostos identificados para os bio-óleos de esterco bovino em porcentagem. ....	71
<b>Figura 43.</b> Processo de pirólise de esterco bovino sob taxa de aquecimento de 10 K min <sup>-1</sup> , relação entre os constituintes e suas temperaturas de degradação. ....	72
<b>Figura 44.</b> Compostos fenólicos majoritários presentes nos bio-óleos. ....	83
<b>Figura 45.</b> TICC das frações aquosas extraídas com DCM. ....	84
<b>Figura 46.</b> Compostos majoritários presentes nas frações aquosas extraídas com DCM. ....	89
<b>Figura 47.</b> TICC das frações aquosas extraídas com <i>n</i> -hexano. ....	90
<b>Figura 48.</b> Compostos majoritários presentes nas frações aquosas extraídas com <i>n</i> -hexano. ....	91
<b>Figura 49.</b> Espectro de massas obtidos por <i>ESI</i> (-)-FTMS para os bio-óleos. .	96
<b>Figura 50.</b> Diagramas de distribuição do DBE versus a distribuição do número de carbonos para os bio-óleos. ....	98
<b>Figura 51.</b> Distribuição de classes para os bio-óleos em <i>ESI</i> (-). ....	98
<b>Figura 52.</b> Diagrama de classes presentes nas análises por <i>ESI</i> (-)-FTMS para os bio-óleos. ....	100
<b>Figura 53.</b> Espectro de massas obtidos por <i>ESI</i> (+)-FTMS para as frações aquosas. ....	104
<b>Figura 54.</b> Diagramas de distribuição do DBE versus a distribuição do número de carbonos para as frações aquosas <i>ESI</i> (+). ....	106
<b>Figura 55.</b> Distribuição de classes para as frações aquosas em <i>ESI</i> (+). ....	106
<b>Figura 56.</b> Diagramas de distribuição do DBE versus a distribuição do número de carbonos para as classes nitrogenadas das frações aquosas <i>ESI</i> (+). ....	107

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Espécies de <i>Fusarium solani</i> associados a doenças em culturas. ....	7
<b>Tabela 2.</b> Espécies de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> associado a doenças em culturas. ....	10
<b>Tabela 3.</b> Condições cromatográficas de análise no GC/MS. ....	33
<b>Tabela 4.</b> Rendimentos (% <i>m/m</i> ) dos produtos da pirólise de esterco bovino. ....	36
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos produtos da pirólise em <i>scale-up</i> do esterco bovino. ....	38
<b>Tabela 6.</b> Teor de hemicelulose, celulose e lignina para diferentes fontes de esterco bovino. ....	38
<b>Tabela 7.</b> Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) dos fungos frente ao solvente DMSO variando a concentração de 1 a 5%. ....	39
<b>Tabela 8.</b> Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente aos bio-óleos. ....	41
<b>Tabela 9.</b> Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo <i>Fusarium solani</i> frente aos bio-óleos. ....	44
<b>Tabela 10.</b> Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente aos bio-óleos contendo 1% de DMSO. ....	48
<b>Tabela 11.</b> Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo <i>Fusarium solani</i> frente aos bio-óleos contendo apenas 1% de DMSO. ....	50
<b>Tabela 12.</b> Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> frente as frações aquosas. ....	52
<b>Tabela 13.</b> Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo <i>Fusarium solani</i> frente as frações aquosas. ....	56
<b>Tabela 14.</b> Porcentagem de inibição do crescimento e desvio padrão das amostras de bio-óleos frente aos fungos. ....	59
<b>Tabela 15.</b> Porcentagem de inibição do crescimento e desvio padrão das amostras de frações aquosas frente aos fungos. ....	60
<b>Tabela 16.</b> Sensibilidade das amostras de acordo com o IC <sub>50</sub> frente aos fungos. ....	64
<b>Tabela 17.</b> Composição elementar de bio-óleos obtidos através de pirólise de esterco bovino a diferentes temperaturas. ....	66

<b>Tabela 18.</b> Composição elementar dos bio-óleos obtidos da pirólise de esterco bovino em reator de cilindro rotativo. ....	66
<b>Tabela 19.</b> Picos cromatográficos identificados para os bio-óleos. ....	70
<b>Tabela 20.</b> Compostos majoritários encontrados nas soluções de bio-óleos de esterco bovino.....	75
<b>Tabela 21.</b> Picos cromatográficos identificados para as frações aquosas extraídas com DCM. ....	85
<b>Tabela 22.</b> Compostos majoritários encontrados para as frações aquosas extraídas com DCM. ....	86
<b>Tabela 23.</b> Picos cromatográficos identificados para as frações aquosas extraídas com <i>n</i> -hexano.....	90
<b>Tabela 24.</b> Compostos majoritários para as frações aquosas extraídas com <i>n</i> -hexano. ....	92
<b>Tabela 25.</b> Relação entre os íons identificados e atribuídos por FT-MS para bio-óleos. ....	95
<b>Tabela 26.</b> Relação entre os íons detectados e atribuídos <i>ESI</i> (+) para a frações aquosas. ....	103

## LISTA DE SIGLAS

<b>BDA</b>	Batata Dextrose Agar
<b>BOD</b>	do inglês <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
<b>bpd</b>	Barris por dia
<b>CFM</b>	Concentração Fungicida Mínima
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>DBE</b>	do inglês, <i>Double Bond Equivalent</i>
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ESI</b>	do inglês, <i>Electrospray Ionization</i>
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
<b>FTIR</b>	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de ( <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> )
<b>FT-MS</b>	Espectrometria de Massas com transformada de <i>Fourier</i>
<b>GC/MS</b>	do inglês, <i>Gas Chromatography/Mass spectrometry</i>
<b>HFF</b>	Hortaliças, frutas e flores
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração para inibir 50%
<b>IEA</b>	Agência Internacional de Energia
<b>kg/p</b>	Quilo por pessoa
<b>LAC-UFS</b>	Laboratório de Análises Cromatográficas
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>OCDE</b>	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
<b>ONU</b>	Organização das Nações Unidas
<b>PIC</b>	Porcentagem de Inibição do Crescimento
<b>THF</b>	Tetraidrofurano
<b>TICC</b>	Cromatograma da Corrente Total de Íons ( <i>Total Current Ion Chromatogram</i> )
<b>USDA</b>	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	Produção e meios de controle .....	3
1.2	Resistência e fungicidas alternativos .....	6
1.3	Fungos fitopatogênicos .....	7
1.3.1.	<i>Fusarium solani</i> .....	7
1.3.2.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	9
1.4	Contexto histórico da conversão térmica de biomassa .....	10
1.4.1.	<i>Biomassa</i> .....	11
1.4.2.	<i>Biomassa Lignocelulósica</i> .....	12
1.4.2.1	<i>Celulose</i> .....	13
1.4.2.2	<i>Hemicelulose</i> .....	14
1.4.2.3	<i>Lignina</i> .....	15
1.4.3	<i>Bio-óleo</i> .....	17
1.4.4	<i>Produção de bovinos e conversão termoquímica de esterco</i> .....	17
1.5	Atividade fungicida, bactericida e pesticidas de bio-óleos .....	22
1.6	A técnica de disco-difusão para a análise da atividade antifúngica .....	23
2.	OBJETIVOS .....	25
2.1.	Objetivo Geral .....	25
2.2.	Objetivos Específicos .....	25
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
3.1.	Fonte de biomassa .....	26
3.2.	Pirólise de esterco bovino .....	26
3.2.1	<i>Conversão da biomassa</i> .....	26
3.2.2	<i>Balanço de massa</i> .....	27

3.3.	Análise da atividade antifúngica. ....	28
3.3.1	<i>Fungos fitopatogênicos. ....</i>	28
3.3.2	<i>Análise de disco-difusão para bio-óleo com 1 a 5% de DMSO. ....</i>	28
3.3.3	<i>Análise de disco-difusão para bio-óleo com DMSO a 1%. ....</i>	30
3.4	Caracterização da fração líquida da pirólise esterco bovino .....	31
3.4.1	<i>Análise Elementar (CHN) para os bio-óleos. ....</i>	32
3.4.2	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para os bio-óleos. ....</i>	32
3.4.3	<i>Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS) para os bio-óleos. ....</i>	33
3.4.4	<i>Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS) para as Frações Aquosas. ....</i>	34
3.4.5	<i>Análise por Espectrometria de Massas com transformada de Fourier (FT-MS) para os bio-óleos e frações aquosas. ....</i>	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
4.1.	Rendimentos dos produtos da pirólise .....	36
4.2	Avaliação da Atividade Antifúngica .....	39
4.2.1	<i>Influência do solvente no crescimento dos fungos. ....</i>	39
4.2.2	<i>Avaliação da Atividade Antifúngica dos bio-óleos variando a concentração de DMSO de 1 a 5%. ....</i>	41
4.2.3.	<i>Avaliação da atividade antifúngica dos bio-óleos frente aos fungos com DMSO a 1%. ....</i>	47
4.2.3.1	<i>Avaliação da atividade antifúngica dos bio-óleos frente ao Lasiodiplodia theobromae com 1% de DMSO. ....</i>	47
4.2.3.2	<i>Avaliação da atividade antifúngica dos bio-óleos frente ao Fusarium solani com 1% de DMSO. ....</i>	49
4.2.4.	<i>Avaliação da atividade antifúngica para as frações aquosas. ....</i>	51

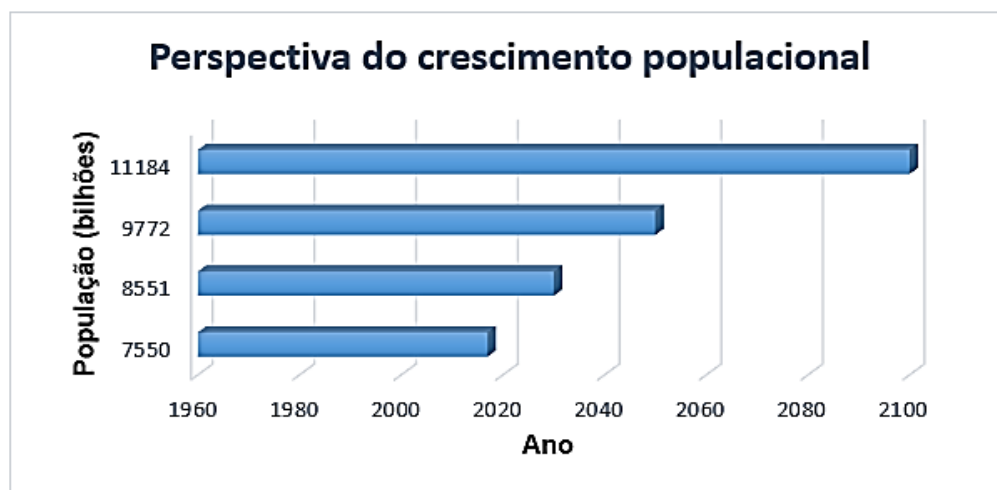
4.2.4.1.	<i>Avaliação da atividade antifúngica das frações aquosas frente ao fungo Lasiodiplodia theobromae</i> .....	52
4.2.4.2.	<i>Avaliação da atividade antifúngica das frações aquosas frente ao fungo Fusarium solani</i> .....	55
4.2.5.	<i>Avaliação da concentração para inibir 50% do crescimento micelial do fungo (IC50)</i> .....	58
4.3	Caracterização da fração líquida da pirólise esterco bovino .....	66
4.3.1	Análise Elementar .....	66
4.3.2	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).</i>	67
4.3.3	<i>Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS) para os Bio-óleos</i> .....	68
4.3.4	<i>Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS) para as frações aquosas</i> .....	84
4.3.4.1.	<i>Extração com Diclorometano</i> .....	84
4.3.4.2.	<i>Extração com n-Hexano</i> .....	89
4.3.5	<i>Caracterização das amostras de bio-óleos e frações aquosas por Espectrometria de Massas com transformada de Fourier (FT-MS);</i> .....	94
4.3.5.1.	<i>Caracterização dos Bio-óleos por ESI(-)-FTMS</i> .....	95
4.3.5.2.	<i>Caracterização das frações aquosas por ESI(+)-FTMS</i> .....	103
5	CONCLUSÕES .....	111
6	PERSPECTIVAS DO TRABALHO .....	112
7	REFERÊNCIAS .....	113



## 1 INTRODUÇÃO

Segundo o estudo de Perspectiva da População Mundial das Nações Unidas (2017), a população mundial continua crescendo, embora em um ritmo mais lento. Em 2007 o crescimento da população era de 1,24% ao ano. No ano do estudo realizado, esse percentual foi reduzido para 1,10% ao ano. Mesmo diante desta redução, isso representa um acréscimo de 83 milhões de pessoas por ano no mundo. Nos próximos 13 anos a população deverá aumentar em mais de um bilhão, sendo estimado o quantitativo de 8,6 bilhões, 9,8 bilhões e 11,2 bilhões de pessoas para 2030, 2050 e 2100, respectivamente [1]. A Figura 1 apresenta o crescimento populacional atual e a projeção para os próximos anos.

**Figura 1.** Perspectiva de crescimento populacional no mundo nas próximas décadas. **Fonte:** Dados adaptados de: World Popul. Prospect.(2017) [1].

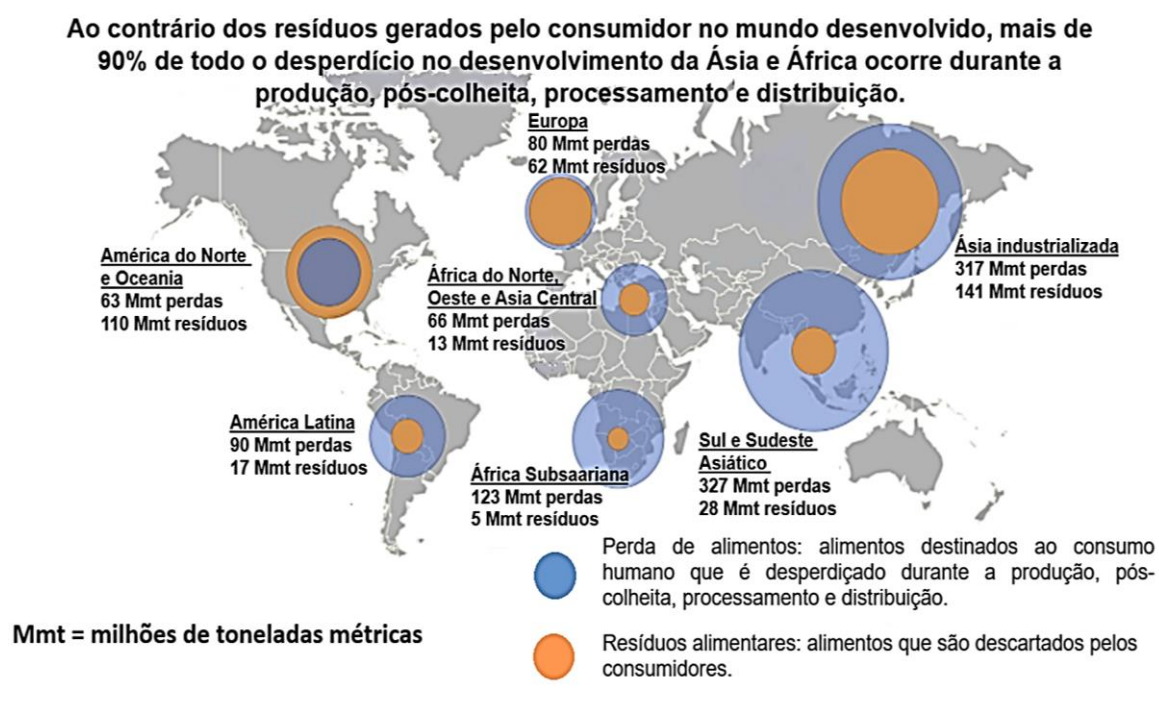


Em virtude do crescimento populacional a produção de grãos deve mais que dobrar para atender às necessidades alimentares da população [2,3]. Diante desse expressivo crescimento a Organização das Nações Unidas (ONU) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) afirmam que há a necessidade de aumento na produção de alimentos em torno de 70 a 100% [4,5].

Entretanto, um dos problemas evidenciados, e que tem dificultado o aumento da produção de alimentos, são as perdas durante o ciclo, que

compreende desde a produção até a mesa do consumidor. Nesse cenário, existem dois modos de perdas: o primeiro que está relacionado aos alimentos que são destinados ao consumo, porém perdidos durante as etapas de produção, pós-colheita, processamento e distribuição; e o segundo, em que os alimentos são descartados pelo consumidor [6]. A Figura 2 apresenta a distribuição de perdas de alimentos no mundo.

**Figura 2.** Distribuição global de desperdício de alimentos e perda de alimentos (milhões de toneladas). **Fonte:** Batt, C. A., 2016 [6].



A perda de alimentos é mais acentuada em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos. Já a quantidade de alimentos produzidos, mas não consumidos em países desenvolvidos é maior que a ingestão total de alimentos em países em desenvolvimento [6].

O crescimento em termos de produção torna-se um desafio, principalmente em virtude das perdas no processo, sendo necessário combinar o uso eficiente da terra agrícola com a conservação da biodiversidade [4]. Aproximadamente um terço dos alimentos produzidos para consumo humano são perdidos ou desperdiçados, o que representa cerca de 1,3 bilhão de toneladas por ano [7].

Dentre as culturas os danos causados pelos fungos e consequentemente o percentual de perdas é distribuído da seguinte forma, 30% para cereais, entre 40 e 50% para raízes, frutas, hortaliças e sementes oleaginosas, 20% para carne e produtos lácteos e 35% dos peixes. Segundo a FAO esses alimentos seriam suficientes para alimentar dois milhões de pessoas [8].

Evitar a perda de alimentos é um ponto importante para reduzir a fome, aumentar a renda e melhorar a segurança alimentar. Isso deve ocorrer independente do nível de desenvolvimento econômico e maturidade dos sistemas de um país, elas devem ser reduzidas ao máximo, pois representam um desperdício em termos de recursos utilizados, como água, terra, energia e insumos. Além disso, alimentos que não serão consumidos levam a emissões de CO<sub>2</sub> desnecessárias [7].

Dentre os principais fatores que contribuem para as perdas de alimentos no mundo, a deterioração por microrganismos talvez tenha uma importância maior que a segurança alimentar, levando em consideração as perdas econômicas e a necessidade de produção. As consequências de consumir alimentos inseguros e doenças transmitidas são fatores expressivos, porém a perda de alimentos devido à deterioração também é devastadora [6].

### **1.1 Produção e meios de controle**

O Brasil é atualmente um dos principais fabricantes e exportadores de alimentos, fibras, carne e energia, e um dos maiores produtores de café, milho, soja, cana-de-açúcar, oleaginosas, laranjas e uvas [9]. Apresentado uma das maiores taxas de crescimento da produtividade agropecuária [10]. Entretanto, estima-se que sem a utilização dos defensivos agrícolas, a produção seria reduzida em 47,6% [11]. Nesse sentido as doenças de culturas precisam ser adequadamente controladas para manter um nível aceitável de rendimentos quantitativos e qualitativos [12].

Além das perdas econômicas relacionadas à redução na produção, o controle de pragas exige medidas que aumentam gastos, contribuindo para que os danos que esses organismos causam à economia e ao meio ambiente também aumentem [9]. Anualmente, os prejuízos mundiais ocasionados em

virtude das perdas econômicas nas colheitas chegam a bilhões de dólares, e estes estão relacionados diretamente com as doenças em plantas [13].

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos da agricultura estão às pragas [11] e os microrganismos que causam doenças em plantas, que incluem fungos, omicetos, bactérias, vírus, protozoários, nematoides e além de plantas invasoras. Dentre todos, os fungos são os que causam as doenças mais destrutivas das plantas e impõem grandes danos aos sistemas naturais e de produção [12].

Fungos fitopatogênicos são altamente destrutivos e responsáveis por verdadeiras tragédias, como exemplo, temos o caso da requeima da batata que afeta severamente as partes aéreas e os tubérculos das plantas, fato que correu na Irlanda nos anos de 1845 e 1846. A batata era a base da alimentação e a doença causada pelo fungo *Phytophthora infestans* causou destruição e perda de 80% da produção. Após este período a população irlandesa foi reduzida em 2,5 milhões de habitantes. Onde 1,5 milhão morreu de fome e desnutrição e um milhão imigrou para outros países, principalmente para os EUA [11].

Um exemplo semelhante ocorreu no Brasil, envolvendo o mal das folhas da seringueira, doença causada pelo fungo *Microcyclus ulei*. Até o início do século 20, o Brasil e o Peru eram os únicos produtores de borracha natural no mundo, obtendo a produção de árvores que cresciam naturalmente na floresta amazônica. Com o objetivo de aumentar a produção foram plantados 70 milhões de mudas de seringueira em uma área de um milhão de hectares, entretanto, o mal-das-folhas devastou as plantações [11].

As perdas econômicas são evidenciadas também durante o pós-colheita, o armazenamento e no transporte de frutas e vegetais [14]. Estes estão frequentemente sujeitos à variação nos níveis de podridões, principalmente devido a fungos patogênicos que geralmente infectam o hospedeiro através de feridas realizadas durante a colheita, manipulação e/ou processamento [15].

Os danos causados por patógenos podem ser minimizados utilizando estratégias de controle bem sucedidas como: redução de seus inóculos, inibição de seus mecanismos de virulência, promoção da diversidade genética em culturas com o uso de plantas geneticamente modificadas e agentes de controle biológico [9,12].

Os produtores, nos últimos anos, têm conseguido evitar perdas expressivas por meio da aplicação de fungicidas, mas não sem despende de valores expressivos [11]. Atualmente, os fungicidas sintéticos são os principais meios de controle de doenças ocasionadas por fungos, durante o plantio e pós-colheita [15,16]. Em especial o imazalil (IMZ), tiabendazol (TBZ), ortofenilfenato de sódio, fludioxonil, pirimetanil ou diferentes misturas destes compostos [15].

O Brasil é um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas, incluindo inseticidas, miticidas, fungicidas e herbicidas, e as vendas desses produtos atingiram US\$ 8,5 bilhões em 2011 [9]. O mercado de defensivos agrícolas no Brasil foi estimado, em 2012, em 9,7 bilhões de dólares (R\$ 19,4 bilhões). Deste valor, o mercado de inseticidas e acaricidas, com 36% (3,6 bilhões de dólares), seguido por herbicidas, representou 33% (3,2 bilhões de dólares), fungicidas com 27% (2,5 bilhões de dólares) e outros, com 4% (0,4 bilhões de dólares).

As principais culturas que utilizam defensivos agrícolas são soja, algodão, cana de açúcar, milho, HFF (hortaliças, frutas e flores), café e citros. Tornando-se evidente a importância do manejo químico das doenças e pragas [11].

Em virtude da ação rápida e eficaz, os fungicidas têm sido amplamente utilizados pelos agricultores para controlar as doenças fúngicas em plantas e numerosas classes de fungicidas foram desenvolvidas e se diferenciam em seus modos de ações [12]. Entretanto, o uso contínuo e sistemático de fungicidas com um mecanismo de ação específico pode levar à seleção de populações de fungos tolerantes. Tornando-se necessário adotar como medida de manejo uma correta rotação de fungicidas para prevenir a seleção de fungos tolerantes, o que exige cada vez mais a oferta de produtos pertencentes a diferentes grupos químicos para atender a essa demanda [11].

Apesar dos fungicidas sintéticos serem amplamente utilizados para proteger as culturas, agora estão em debate devido ao desenvolvimento da resistência, bem como as preocupações ambientais [17]. Além disso, o uso de fungicidas está se tornando cada vez mais restrito devido à regulamentação, carcinogenicidade, alta toxicidade residual e aguda, longo período de

degradação, poluição ambiental, e com a crescente preocupação do público com resíduos químicos em frutas [15].

## **1.2 Resistência e fungicidas alternativos.**

O uso contínuo desses fungicidas resultaram em fungos com múltiplas resistências, complicando ainda mais o tratamento das doenças [15]. Muitos dos fungos economicamente importantes desenvolveram níveis de resistência alta a moderada a fungicidas, como por exemplo, para o dicarboximides, fenilamidas, 2-amino-pirimidinas, aminas, entre outros [18].

Devido ao efeito negativo de produtos químicos sintetizados e o aumento da resistência de patógenos, além do alto custo de criar novos produtos químicos, os métodos de controle alternativos tornaram-se necessários [19]. Neste contexto, os fungicidas alternativos emergem como uma ferramenta promissora para controle de doenças em plantas, e o crescente interesse pode ser observado na busca de novos compostos naturais com essas propriedades [17].

Recentemente, várias abordagens biológicas e promissoras foram propostas como potenciais aos fungicidas sintéticos no controle de doenças. Entre as várias alternativas estão os compostos derivados de plantas como os óleos essenciais, que são compostos naturais, voláteis e complexos, conhecidos por seus efeitos antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antioxidantes e propriedades medicinais [15].

Diante do emergente mecanismo de resistência dos fungos a fungicidas já utilizados comercialmente, os fungicidas alternativos são um ponto importante na busca por novos componentes que possuam a ação antifúngica, nesse sentido a biomassa que também tem seu estudo ampliado devido ao alto valor agregado de seus produtos pode ser uma fonte viável para a produção de fungicidas alternativos, além de manter o equilíbrio em termos de poluição, é uma fonte econômica de produção, uma vez que, o esterco não possui um alto valor comercial.

### 1.3 Fungos fitopatogênicos

Os fungos fitopatogênicos causam muitos danos as culturas [16]. Uma vez que o fungo é introduzido em um jardim, viveiro, estufa ou campo, pode sobreviver por anos em uma variedade de tipos de solos, independentemente de qualquer planta hospedeira [20]. As infecções não resultam apenas em uma redução nos rendimentos e, portanto, em perdas econômicas, mas também na produção de micotoxinas que ameaçam a saúde humana e animal [17].

#### 1.3.1. *Fusarium solani*

O gênero *Fusarium* pertence à família *Nectriaceae*, é um fungo filamentoso, sendo amplamente distribuído no solo [20], constituindo-se de algumas das espécies de fitopatógenos mais agressivas [21,22]. Esse patógeno causa doenças em uma ampla gama de plantas, incluindo frutas, vegetais, cereais e plantas ornamentais. Muitas plantas têm pelo menos uma doença associada ao *Fusarium*, que são conhecidas por infectar várias partes da planta, desde as raízes até as partes aéreas [25,26].

Sob condições ambientais favoráveis, podem causar deterioração cortical, podridão da raiz, murchidão das folhas e, finalmente, a morte prematura das plantas, conhecida também como morte súbita [18,22]. A Tabela 1 apresenta alguns estudos cujas as doenças em culturas estão associadas ao *Fusarium solani*.

**Tabela 1.** Espécies de *Fusarium solani* associados a doenças em culturas.

Espécie	Cultura	Doença/Sintoma	País	Referência
<i>F. solani</i> f. sp. <i>phalaenopsis</i>	Orquídeas ( <i>Phalaenopsis</i> )	Amarelamento de folhas	Taiwan	J. Mansfield <i>et al.</i> , 2012 e Leslie, J. F.; Summerell, B., 2006 [22,24].
<i>F. solani</i> f. sp. <i>phalaenopsis</i>	Orquídeas	Mancha foliar, ferrugem da folha, podridão foliar e do pseudobulbo	Havaí	Srivastava, S.; Kadooka, C.; Uchida, J. Y., 2018 [20].

*Continua...*

...Continuação da tabela 1

<i>F. solani</i>	Morango	Podridão da raiz e frutos	Espanha e Paquistão	De la Lastra <i>et al.</i> , 2018 [26].
<i>Fusarium solani</i> (Fso14)	Oliveiras ( <i>Olea europaea</i> L.)	Podridão radicular	Tunísia	Ben Amira <i>et al.</i> , 2017 [21]
Vinte isolados de espécies de <i>Fusarium</i> (FS1-FS20)	Feijoeiro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Podridão da Raiz	Camarões	Toghueo <i>et al.</i> , 2016 [27]
<i>F. solani</i>	Manga ( <i>Mangifera indica</i> L.)	Mancha foliar	Malásia	Omar <i>et al.</i> , 2018 [23]

Nos seres humanos, é conhecido por causar micotoxicoses, queratites fúngicas e muitas outras infecções localizadas e invasivas, afetando principalmente a indivíduos imunocomprometidos [18]. O primeiro caso de peritonite em paciente com cirrose hepática em estágio terminal ocasionado por *Fusarium solani* foi relatado em uma paciente de 56 anos de idade em uma unidade na Alemanha [28].

Uma mulher de 58 anos apresentando a síndrome mielodisplásica (SMD), com risco de evolução para leucemia mielóide aguda, relatou uma lesão dolorosa com crosta aproximadamente 7 por 5 cm que evoluiu para úlceras, sendo o *Fusarium solani* associado ao sarcoma granulocítico, detectado após cultura, microscopia eletrônica e sequenciamento de DNA [29]. Um outro caso ocorreu a uma mulher de 43 anos com uma úlcera de córnea refratária em seu olho esquerdo, sendo detectado o caso de queratite, após análise metagenômica o *Fusarium solani* foi detectado [30].



### 1.3.2. *Lasiodiplodia theobromae*

*Lasiodiplodia theobromae* é um membro da família *Botryosphaeriaceae*, foi reconhecido como um importante patógeno da madeira mundialmente associado a vários sintomas da doença, incluindo destruição, podridão do tronco, goma e declínio [28,29]. Esta família contém inúmeras espécies de fungos que ocorrem como saprófitas, parasitas ou endófitos em uma variedade diversificada de hospedeiros de plantas [30,31,32].

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* se destaca na agricultura devido a perdas em espécies de frutas tropicais, tanto no sistema de cultivo como na pós-colheita [36]. Das inúmeras doenças que comprometem a produção de caju, a resinose que é causada por *Lasiodiplodia theobromae* é considerada uma das doenças mais importantes para a indústria [30,37]. Esta espécie de fungos foi relatada pela primeira vez nessa cultura em 1990 e logo foi reconhecida como uma das doenças mais importantes da safra no nordeste do Brasil [30,38,39].

Os principais sintomas desta doença compreendem o aparecimento de lesões ao longo do tronco e/ou ramos, que se desenvolvem ao longo do tempo e liberam uma goma característica, resultando na redução do transporte de água e nutrientes, deterioração do ramo, queda da inflorescência, redução da fotossíntese e eventual morte da planta [30,38,39].

A produção de caju tem considerável importância social e econômica em muitos países, incluindo o Brasil, a Índia e alguns países africanos, particularmente porque as nozes e pedúnculos (pseudofrutos) têm inúmeros usos econômicos [33,34]. A indústria brasileira de caju é uma das principais fontes de emprego e renda, contribuindo em grande parte para a economia do Nordeste do Brasil [35,36].

Além da resinose, o *Lasiodiplodia theobromae* já foi relatado em outras culturas. A Tabela 2 apresenta estudos de doenças em culturas associadas ao *Lasiodiplodia theobromae*.

**Tabela 2.** Espécies de *Lasiodiplodia theobromae* associado a doenças em culturas.

Espécie	Cultura	Doença/Sintoma	País	Referência
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Cachos de videira cv. Itália Uva	Podridão seca	Brasil	Peixinho <i>et al.</i> , 2017 [44]
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Abacate	Podridão do caule	Canadá	Maftoonazad <i>et al.</i> , 2007 [45]
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Falcataria moluccana</i>	Cancro (lesões em folhas, frutos e ramos)	China	Ji <i>et al.</i> , 2017 [46]
Espécies de <i>Lasiodiplodia</i>	Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	Morte da planta	Peru	Rodríguez-Gálvez <i>et al.</i> , 2017 [47]
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Seringueira ( <i>Hevea brasiliensis</i> )	podridão mole	Índia	Sajitha, K. L.; Maria Florence, E. J.; Dev, S. A., 2014 [48]

Casos de doenças em humanos associada ao *Lasiodiplodia theobromae* também são relatados. Um paciente com 59 anos apresentou uma lesão cutânea no dorso do pé direito ocasionando um inchaço, a identificação do *Lasiodiplodia theobromae* foi confirmada por sequenciamento de DNA [49]. Queratite foi detectada em um paciente com 68 anos no Departamento de Oftalmologia do Forte de UHC França, relatando dor e diminuição da visão do olho direito, sendo o *Lasiodiplodia theobromae* identificado como agente causal da doença [50].

#### 1.4 Contexto histórico da conversão térmica de biomassa

O aumento na demanda por energia está diretamente relacionado ao crescimento populacional e ao desenvolvimento econômico [40,41]. Antes da revolução industrial, a energia era obtida de recursos naturais e da produção

florestal. Porém a descoberta do petróleo bruto em 1860, mudou o modo de consumo de energia para um padrão insustentável, sendo o petróleo a base da energia mundial [52].

As fontes de energia amplamente utilizadas ainda estão limitadas aos fósseis convencionais, como o carvão, o petróleo e o gás natural [53]. Entretanto, o interesse em fontes alternativas de energia aumentou profundamente durante as duas últimas décadas devido às preocupações com o meio ambiente, o impacto dos combustíveis fósseis tradicionais, sua longevidade e flutuação constante dos preços [54].

Atualmente, as mudanças climáticas e a diminuição dos recursos de petróleo são questões fundamentais para a maioria dos países do mundo. Os dados disponíveis mostram que o consumo global de combustível a base de petróleo foi de 85,7 milhões de barris por dia (bpd) em 2008, que é estimado para aumentar para 97,6 milhões bpd em 2020 e 112,2 milhões bpd em 2035. O desequilíbrio entre o aumento da demanda e a falta de energia será um desafio global em um futuro próximo [55].

#### *1.4.1. Biomassa*

Podemos definir biomassa como toda matéria orgânica de origem animal, vegetal ou microrganismos, passível de ser transformada em energia (bioenergia) [56]. Ela inclui diferentes tipos de materiais biológicos como: madeira, resíduos agrícolas, culturas energéticas, algas, resíduos animais, fração orgânica de lixo, entre outras [57]. Os principais elementos que constituem a biomassa são: carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Ela ainda pode conter enxofre, porém em menor proporção, e espécies inorgânicas [56].

Devido à sua renovabilidade e equilíbrio neutro em CO<sub>2</sub>, aparece como uma matéria-prima sustentável e promissora para substituir parcialmente os combustíveis fósseis, reduzindo as emissões de CO<sub>2</sub> e ajudando a minimizar os efeitos antropogênicos que contribuem para o aquecimento global [54].

Por ser um recurso amplamente disponível na natureza, acredita-se que a produção de biomassa gire em torno de bilhões de toneladas por ano. Ela

tem o potencial de produzir calor, eletricidade, combustível e produtos químicos. A Agência Internacional de Energia (IEA) sugere que os biocombustíveis até 2050 possam contribuir em 27% do combustível utilizado para o transporte mundial [58].

Nesse cenário a biomassa surge como uma fonte alternativa e tem atraído cada vez mais interesse de pesquisadores [40,42]. Após o carvão, o petróleo e o gás natural, a biomassa é a quarta maior fonte de energia primária do mundo (representando 12% do consumo total de energia), aumentando para quase 40% em alguns países em desenvolvimento [41,43].

Alguns processos estão disponíveis para a conversão térmica de biomassa dos quais destacamos a combustão, a pirólise e a gaseificação. A pirólise é a decomposição térmica que ocorre na ausência de oxigênio, e foi aceito como um método potencial em relação ao custo razoável e operação simples para conversão de biomassa [51]. Os principais produtos da pirólise são o biocarvão, bio-óleo e bio-gás [59].

#### *1.4.2. Biomassa Lignocelulósica*

Materiais lignocelulósicos incluem resíduos agrícolas, resíduos florestais, gramíneas e materiais lenhosos com potencial para a produção de biocombustíveis. Além disso, eles possuem uma estrutura complexa em que os constituintes principais também podem sofrer variações em função da variabilidade genética entre diferentes fontes [60].

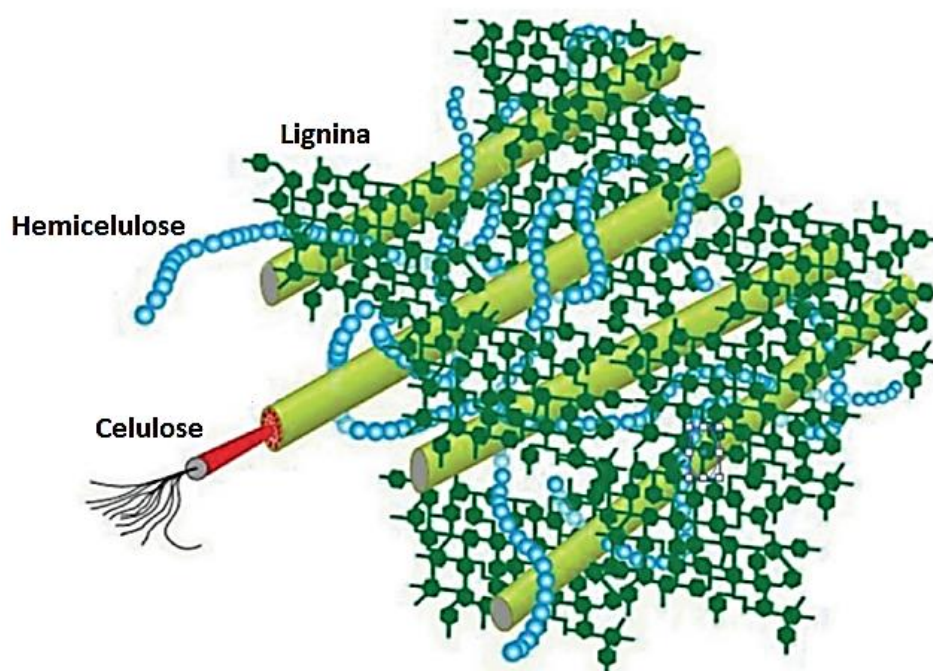
A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por três constituintes: celulose, hemicelulose e lignina [46,49]. Sendo que as proporções desses três componentes podem variar, dependendo do tipo de biomassa e a parte da planta amostrada. [44,49]. Como exemplo, a casca de avelã contém até 51,3% de lignina, enquanto as folhas das árvores são livres de lignina [61].

Apesar da variação, normalmente a maioria das biomassas lignocelulósicas são compostas de cerca de 10%-25% de lignina, 20%-30% de hemicelulose e 40%-50% de celulose [46,48]. Além desses componentes principais, a biomassa também pode conter pequenas quantidades de

compostos inorgânicos, lipídeos e proteínas que podem ser solúveis em água [44,49].

As paredes celulares de biomassa lignocelulósica são formadas por macromoléculas de celulose que regularmente unem-se para formar microfibras resistentes que funcionam como o esqueleto da parede celular, revestida por uma matriz de hemicelulose e cujos espaços vazios são preenchidos com lignina [44,46,49]. A Figura 3 apresenta a estrutura da célula vegetal constituída de celulose, hemicelulose e lignina.

**Figura 3.** Celulose, hemicelulose e lignina em células vegetais. **Fonte:** Wang, S.; Dai, G.; Yang, H.; Luo, Z.(2017) [58].

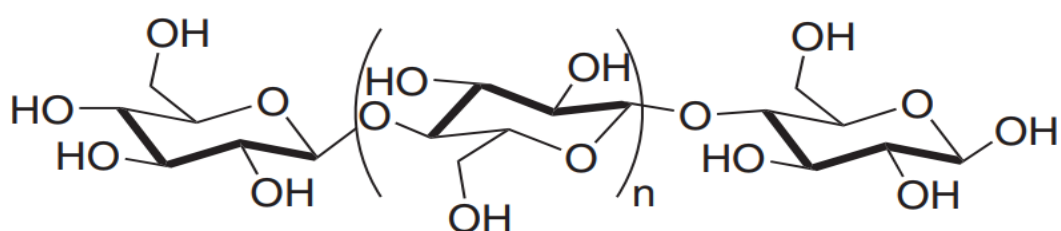


#### 1.4.2.1 Celulose

Representando cerca de 40% a 50% da biomassa vegetal, a celulose é um dos principais componentes das paredes celulares das plantas [60]. É um polissacarídeo linear, tipicamente consistindo de milhares de monômeros de D-glicose [61], um anel de seis carbonos, também conhecido como piranose [62].

Os grupos hidroxilas do anel de piranose podem interagir formando pontes de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, conferindo a celulose uma estrutura cristalina e suas propriedades únicas de resistência mecânica e estabilidade química [48-50]. A Figura 4 apresenta a estrutura química da celulose.

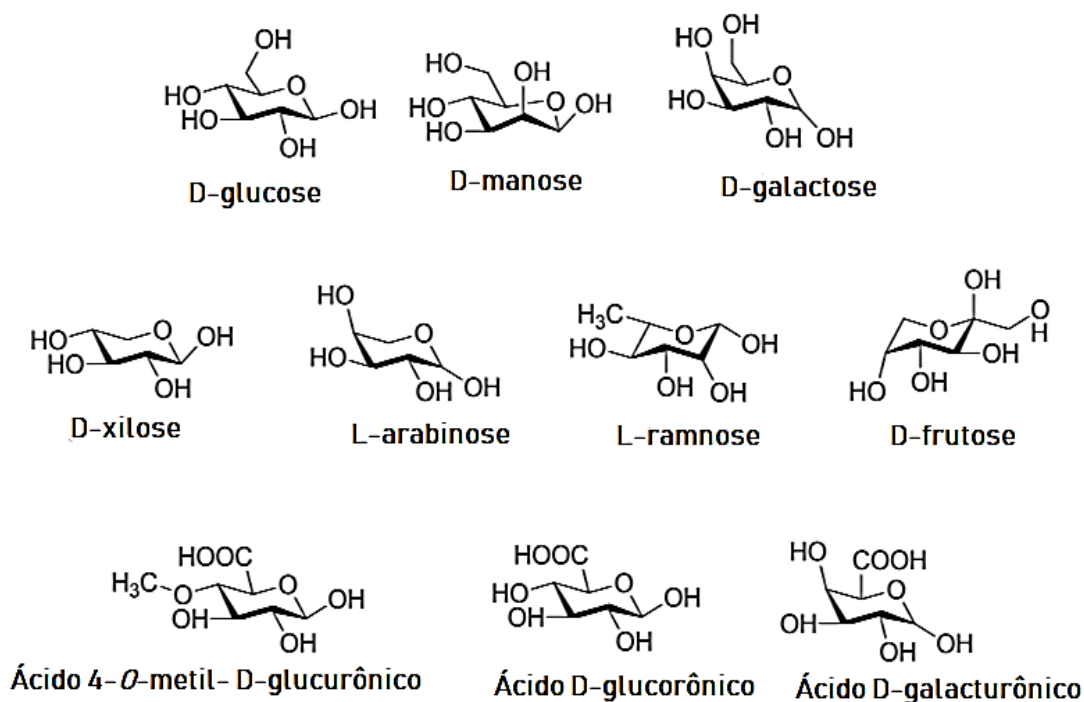
**Figura 4.** Estrutura da celulose. **Fonte:** Adaptada de Dhyani,V.; Bhaskar, T. (2017) [62].



#### 1.4.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante da natureza [60], é um polissacarídeo composto de vários monômeros de carboidratos como: galactose, xilose, arabinose, manose, glicose e ácido glucurônico [49,50]. Ela liga-se fortemente através de atrações não covalentes à superfície de cada microfibrila de celulose. A degradação rápida está associada a sua natureza amorfa, estruturalmente a hemicelulose não é cristalina, devido principalmente a sua estrutura altamente ramificada e presença de grupos acetil ligados a cadeia polimérica [62]. A Figura 5 apresenta a estrutura química das unidades constituintes da hemicelulose.

**Figura 5.** Estrutura das unidades constituintes da hemicelulose. **Fonte:** Wang, S.; Dai, G.; Yang, H.; Luo, Z. (2017) [58].

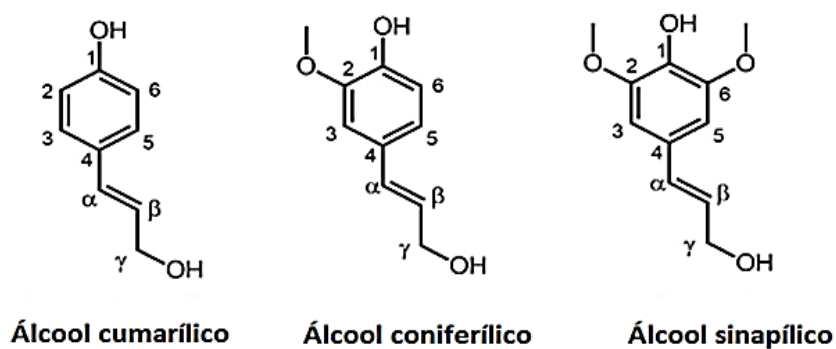


#### 1.4.2.3 Lignina

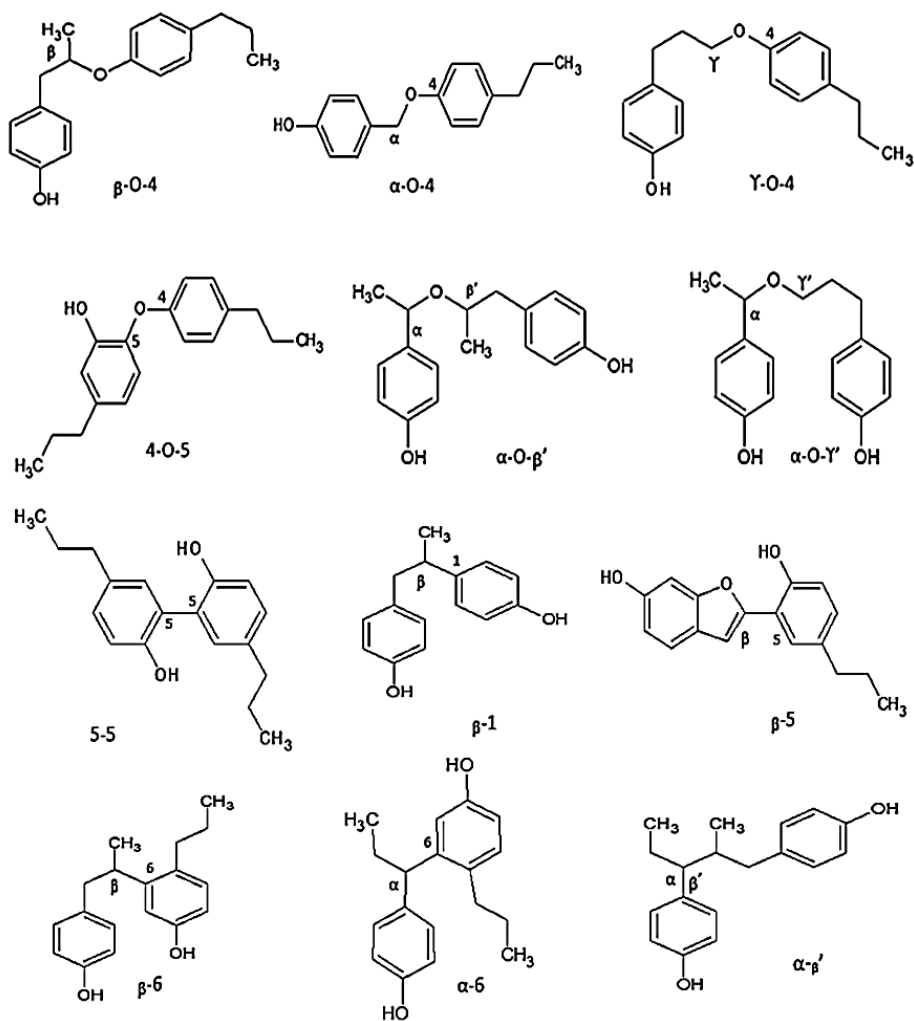
A lignina é um polímero aromático de cadeia longa composta por unidades de fenil-propano, grupos metóxi e poli-fenólicos não-hidratos, apesar representar em média de 10% a 25% da biomassa é a fração mais complexa. A função da lignina na parede celular é manter a rigidez estrutural e a ligação entre celulose e hemicelulose. As ligações entre a celulose e hemicelulose é hidrogenada, enquanto a lignina e a hemicelulose estão ligadas covalentemente.

Essas ligações influenciam o processo pirolítico, dificultando a decomposição e causando desempenhos diferentes se comparado a diversidade de fontes existentes de biomassa lignocelulosa [61]. A lignina contém três álcoois aromáticos, o cumarílico, o coniferílico e o sinapílico, que formam um selo protetor em torno da celulose e hemicelulose [48-50]. A Figura 6 apresenta as unidades básicas do polímero de lignina e a Figura 7 a variação das ligações na estrutura da lignina.

**Figura 6.** Unidades básicas de polímero de lignina. **Fonte:** Wang, S.; Dai, G.; Yang, H.; Luo, Z.(2017) [58].



**Figura 7.** Estruturas de ligação da lignina. Fonte: Wang, S.; Dai, G.; Yang, H.; Luo, Z.(2017) [58].





### 1.4.3 Bio-óleo

Considerando as inúmeras fontes, os bio-óleos contêm uma ampla gama de compostos, portanto, podem ser encontrados em diversas composições. Os pesquisadores relataram que o conteúdo de bio-óleos pode incluir várias classes químicas, como cetonas, ácidos carboxílicos, alcenos, fenóis, aldeídos e álcoois [63].

Apesar de ter um baixo teor de carbono, os biocombustíveis são ecologicamente corretos, pois possuem conteúdo desprezível de enxofre, azoto e cinzas; o que leva a uma menor emissão de  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_x$  e fuligem, comparado aos combustíveis fósseis convencionais. Além disso, o  $\text{CO}_2$  libertado durante a combustão de biocombustíveis é absorvido por plantas para a fotossíntese, equilibrando assim o ciclo de  $\text{CO}_2$  [62].

Nos últimos anos, muitos tipos de pesquisa voltadas ao estudo da pirólise de biomassa foram realizadas em uma tentativa de otimizar o processo, sendo que mais de 100 tipos diferentes de biomassa já foram analisados [51]. Entre os resíduos agrícolas já foram testados: "cascas" de amêndoas, avelã, arroz, palha de milho, algodão, trigo, folhas de bananeira, caroços de seriguela, caule de alho, resíduo de uva, resíduos de azeitona, caule de pimenta, semente de cártamo, bagaço de sorgo, bagaço de girassol, entre outras [62].

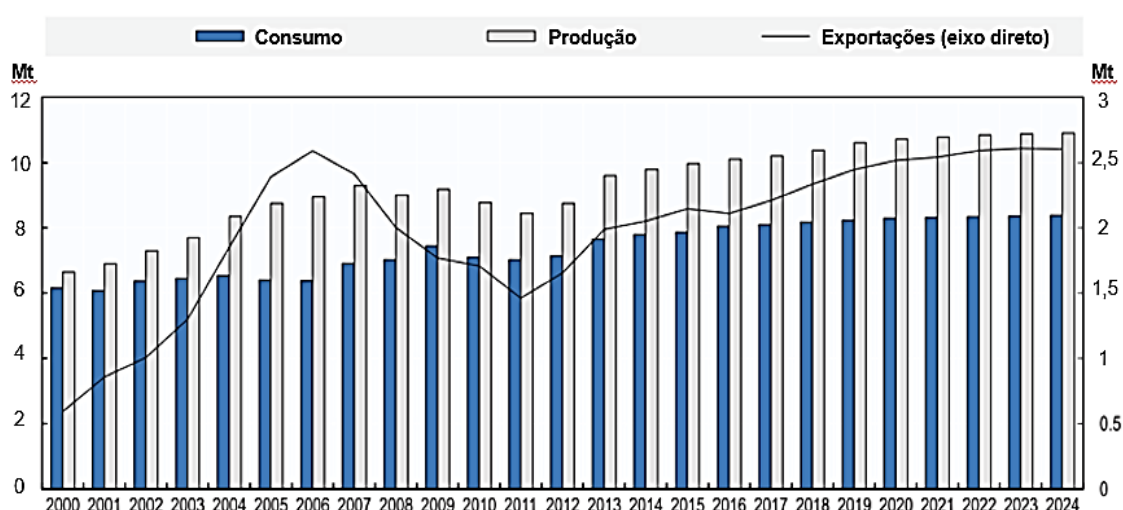
Os parâmetros do processo afetam fortemente o rendimento e a composição de produtos de pirólise, devido às várias reações químicas favoráveis em cada condição. Os principais parâmetros são: o tamanho de partícula, taxa de aquecimento, temperatura de pirólise, taxa de fluxo de gás, taxa de alimentação e tempo de residência [51].

### 1.4.4 Produção de bovinos e conversão termoquímica de esterco

Segundo o estudo realizado pela OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2015-2024 (2015), o Brasil se destaca como segundo maior exportador agrícola mundial, sendo ainda um grande produtor de milho, arroz e carne bovina que é consumida em sua maioria pelo mercado interno. Em virtude de uma forte demanda internacional futura a previsão é que ocorra uma expansão

do rebanho bovino brasileiro e consequentemente um maior número de bovinos sejam abatidos para atender o mercado mundial. As exportações de carne bovina devem crescer em média 2,7% ao ano, o que representa 2,6 milhões de toneladas e cerca de 37% se comparada ao percentual do ano de 2015 do respectivo estudo [64]. A Figura 8 apresenta as projeções da produção, consumo e exportação para os próximos anos.

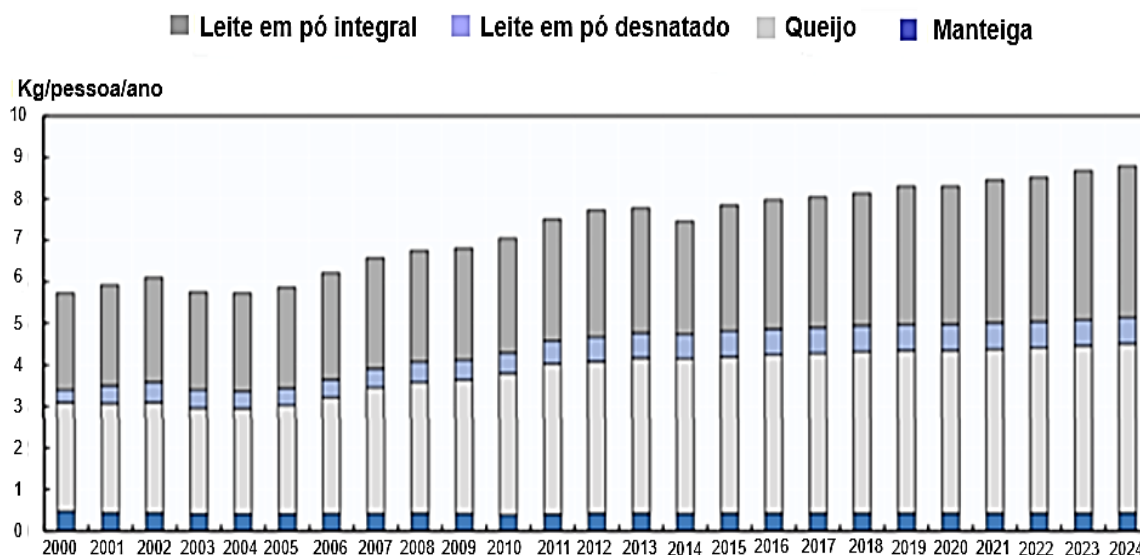
**Figura 8.** Produção, consumo e exportações de carne bovina no Brasil. **Fonte:** OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2015-2024 (2015) [64].



O Brasil também é autossuficiente em laticínios e produtos lácteos [64]. A produção de leite deverá crescer nos próximos 10 anos a uma taxa anual entre 2,1 e 3,0%. Essas taxas correspondem a passar de uma produção de 34,5 bilhões de litros em 2017 para valores entre 43,0 e 48,0 bilhões de litros no final do período das projeções [65].

Portanto, o rebanho bovino deve aumentar e a produção de leite acompanha a demanda interna, o crescimento da população e da renda. Nos próximos dez anos os produtos lácteos serão responsáveis por 53% do consumo da produção brasileira de leite. Estima-se que em 2024 o consumo per capita de produtos lácteos chegue a 84 kg/p [64]. A Figura 9 apresenta os principais produtos lácteos consumidos pelos brasileiros (leite em pó integral, desnatado, queijo e manteiga).

**Figura 9.** Consumo per capita de produtos lácteos no Brasil. **Fonte:** OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2015-2024 (2015) [64].

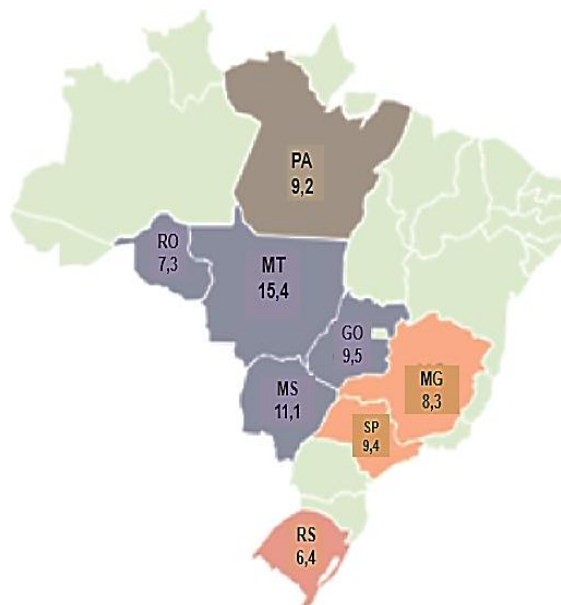


O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2017) estima que o Brasil em 2026 será primeiro exportador de carne bovina, sendo a Austrália o segundo, seguida pela Índia e Estados Unidos. Dados do IBGE (2017) revelam que em 2016 foram abatidas 29,7 milhões de cabeças de gado em todo o país [65].

Os estados que lideram os abates são: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Pará, Rondônia e Rio Grande do Sul, representando 76,6% dos abates no país. Em 2014 o país possuía 212,3 milhões de cabeças, distribuídas da seguinte forma: 33,5% encontravam-se no Centro-oeste, 21,6% no Norte, 18,1% no Sudeste, 13,8% no Nordeste e 12,9% no Sul. No Centro-oeste, o maior efetivo estava em Mato Grosso e no Norte, Pará e Rondônia concentravam o maior efetivo [65]. A Figura 10 apresenta a distribuição de abate de bovinos por estado brasileiro.

**Figura 10.** Distribuição de abate de bovinos por estado. **Fonte:** MAPA - Projeções do Agronegócio de 2016/2017 a 2026/2027 (2017) [65].

BOVINOS	Animais abatidos 2016 (cabeças)	%
Produção Nacional	29.668.976	100
<b>Principais estados produtores</b>		
Mato Grosso	4.577.459	15,4
Mato Grosso de Sul	3.292.279	11,1
Goiás	2.821.463	9,5
São Paulo	2.792.350	9,4
Pará	2.731.398	9,2
Minas Gerais	2.469.873	8,3
Rondônia	2.155.315	7,3
Rio Grande do Sul	1.897.834	6,4
<b>Total</b>	<b>22.737.971</b>	<b>76,6</b>



A necessidade do aumento da produção e o confinamento resultam ao subproduto inevitável na indústria de criação de gado, o esterco bovino, este se não tratado adequadamente, pode resultar em inúmeros problemas ambientais, incluindo poluição de corpos d'água por nitrogênio e potássio e emissões de metano [66].

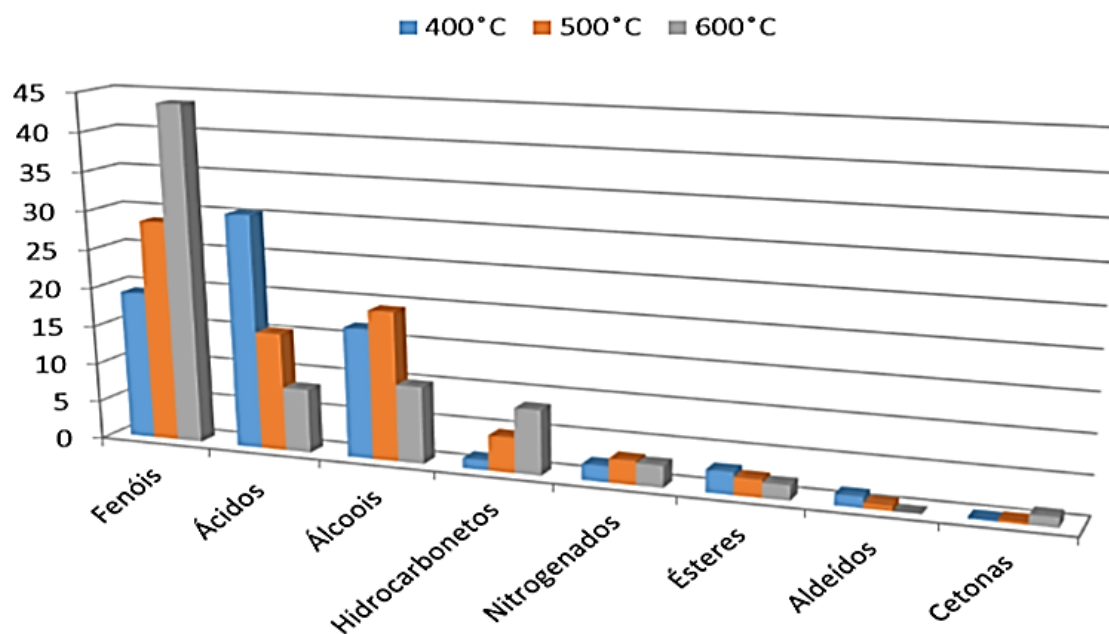
A conversão termoquímica é considerada uma das técnicas mais promissoras para o tratamento de resíduos, alcançando tanto uma recuperação em termos de energia, quanto o controle da poluição [59]. Além das vantagens de eliminar odores e patógenos de esterco animal e redução do volume de fluxo dos resíduos [66], o esterco bovino contém ainda celulose, hemicelulose e lignina, que tem um grande potencial na produção de compostos com alto valor agregado [59].

Embora a pirólise rápida seja considerada um dos candidatos mais promissores para a produção de combustível líquido, bio-óleos foram testados em muitos outros campos industriais. Uma gama de produtos químicos, incluindo aromatizantes de alimentos, levoglucosano, hidroxiacetaldeído,

fertilizantes e produtos agroquímicos podem ser extraídos ou derivados de bio-óleo. Além disso, foram testados também como conservantes alternativos em madeira por apresentarem uma quantidade considerável de compostos fenólicos derivados da lignina, exibindo propriedades de preservação da madeira [67].

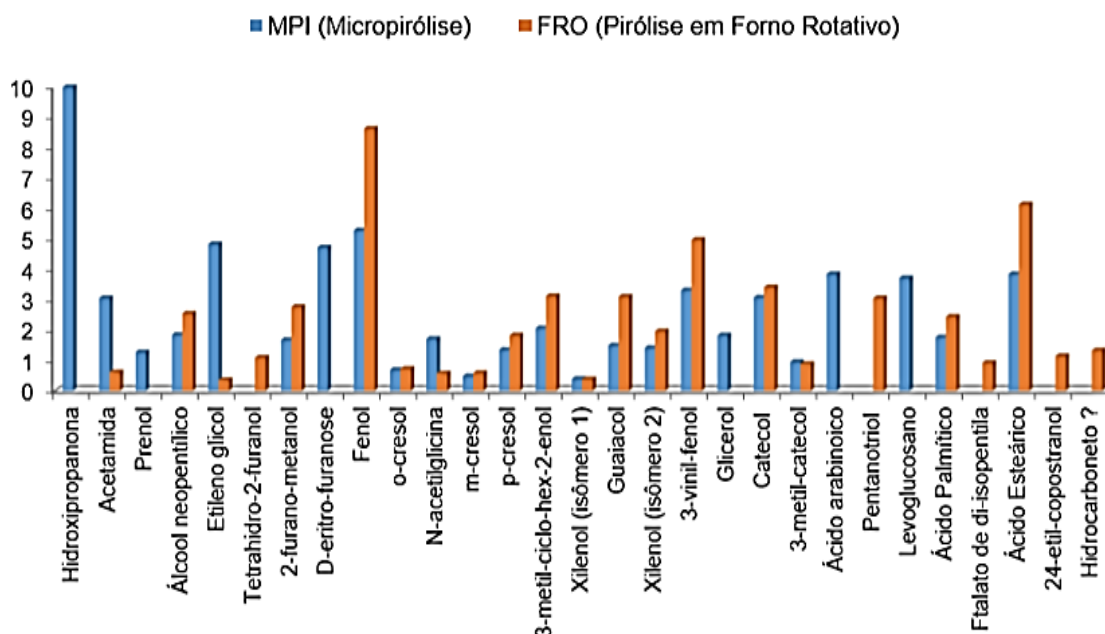
Análises por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas realizada para os bio-óleos de esterco bovino apresentaram oito classes químicas diferentes: fenóis, ácidos carboxílicos, álcoois, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados, ésteres, aldeídos e cetona. Os compostos fenólicos foram predominantes nas amostras de bio-óleos do esterco bovino, seguida pela classe de ácidos e álcoois. Os dados correspondentes para os ácidos carboxílicos mostram que com o aumento da temperatura, há uma diminuição, enquanto que os compostos pertencentes à classe dos fenóis foram aumentados [68]. A Figura 11 que representa os dados desse estudo é apresentada a seguir.

**Figura 11.** Distribuição das classes dos compostos tentativamente identificados para os bio-óleos do esterco bovino. **Fonte:** Santana, K. V. R. (2017) [68].



Na temperatura de 500 °C foi obtido um número maior de compostos detectados e identificados, realizando assim uma comparação das áreas percentuais dos compostos majoritários, apresentados na Figura 12 a seguir.

**Figura 12.** Distribuição das áreas percentuais dos compostos majoritários tentativamente identificados nas amostras de bio-óleo obtido a 500 °C. **Fonte:** Santana, K. V. R. (2017) [68].



### 1.5 Atividade fungicida, bactericida e pesticidas de bio-óleos

As aplicações de bio-óleo como agente pesticida, fungicida ou bactericida são apresentadas em alguns estudos, por exemplo, Bedmutha *et al.* (2011) [69] analisaram o potencial do bio-óleo da borra do café como pesticida, identificando compostos relacionados ao fenol com uma área de pico cromatográfico de aproximadamente 15% no bio-óleo. Desse percentual uma área total de pico para o cresol foi de aproximadamente 22%. Este foi o primeiro estudo a reportar um novo uso de pesticidas utilizando o bio-óleo da borra do café, avaliando a atividade inibitória em bactérias patogênicas das plantas e o besouro da batata do Colorado [69].

Okutucu *et al.* (2011) [70] investigaram as propriedades fungicidas do bio-óleo produzidos a partir da casca de pistache, obtendo atividade fungicida

para todos os fungos testados na concentração de 10 a 50 mg mL<sup>-1</sup>, a atividade foi associada ao conteúdo fenólico presente no bio-óleo. Indicando que as propriedades antifúngicas do bio-óleo são valiosas no combate à decomposição da madeira, como agente de preservação, sozinho ou combinado com biocidas comerciais, como o cresoato e pentaclorofenol [70].

Kim *et al.* (2012) [67] produziram o bio-óleo a partir da serragem de Ypê (*Liriodendron tulipifera*) e testaram a atividade de preservação da madeira, no experimento blocos de madeira YP (*L. tulipifera*) foram imersos em soluções contendo de 25 a 100% do bio-óleo. Os blocos de madeira que foram tratados com o bio-óleo entre 75% e 100%, apresentaram perdas de 4,5 a 10 vezes menores para os fungos de podridão da madeira *Tyromices palustris* e *Trametes versicolor* do que para o controle. As soluções contendo 75% de solução de bio-óleo foram analisadas por GC/MS, sendo identificados 30 compostos, onde 17 foram identificados como derivados fenólicos, entre eles o cresol, o guaicol, o eugenol e o isoeugenol [67].

Lourençon *et al.* (2016) [71] obtiveram o bio-óleo da madeira de eucalipto e testaram a resistência à deterioração do pinheiro, usando o *Gloeophyllum trabeum* (Pers. Ex Fr.) Murr. e *Trametes versicolor* (Linnaeus ex Fr.) Pilat.fungi, fungos que promovem a decomposição marrom e branca, respectivamente. O bio-óleo depositado sobre a superfície da madeira diminuiu significativamente a decomposição. O pinheiro com menor carga de bio-óleo (10%) apresentou resistência de 2,6 e 4,5 vezes contra os fungos. As concentrações de bio-óleo de 50% a 100% causaram a mortalidade de toda as colônias de fungos nos primeiros dias de teste. Os compostos identificados foram principalmente aldeídos, cetonas, e fenóis como o guaiacol e eugenol, atribuindo as propriedades biocidas aos compostos fenólicos derivados da lignina [71].

## 1.6 A técnica de disco-difusão para a análise da atividade antifúngica

O estudo da atividade antifúngica do bio-óleo de esterco bovino teve como base as metodologias utilizadas para a análise de óleos essenciais. Fatores como volatilidade do óleo, insolubilidade em água e sua complexidade

química dificultam a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Atualmente vários métodos são usados e fatores importantes que influenciam os resultados frequentemente não são levados em consideração e podem levar a erros de análise. A técnica usada, o meio de cultura, densidade do inóculo, o óleo essencial e a quantidade do agente emulsificador devem ser considerados [57].

Para facilitar a dispersão da amostra no meio de cultura é necessário a utilização de solventes, detergentes, ou agentes emulsificantes, essa prática é comum e visa melhorar a qualidade dos procedimentos, são exemplos, Tween 20, Tween 80, DMSO e etanol [57]. A estrutura molecular dos emulsionantes é constituída de uma parte hidrofílica e outra lipofílica, tornando-se moléculas anfifílicas de superfície ativa. Durante a emulsificação, eles impedem a agregação de gotículas de óleo, formando a interface óleo-água [58].

Quando há a introdução do agente emulsificador, ele pode interagir com a substância em estudo e causar mudanças nas propriedades físico-químicas dos ensaios, agindo de forma antagônica ou sinergicamente aos componentes ativos do óleo, resultando na potencialização ou na redução da atividade antimicrobiana, esta última é causada pela formação de micelas que dificultariam o contato direto do óleo com os microrganismos [58,60].



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do bio-óleo e da fração aquosa, obtidos através da pirólise de esterco bovino, frente aos fungos *Fusarium solani* e *Lasiodiplodia theobromae*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antifúngica dos bio-óleos de esterco bovino produzidos a 400 °C, 500 °C e 600 °C através da técnica de disco-difusão;
- Avaliar a atividade antifúngica das frações aquosas produzidas a 400 °C, 500 °C e 600 °C através da técnica de disco-difusão;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos bio-óleos e das frações aquosas;
- Determinar a concentração fungicida mínima (CFM) dos bio-óleo e das frações aquosas;
- Caracterizar qualitativamente as amostras de bio-óleos e frações aquosas, provenientes da pirólise de esterco bovino, através da técnica de Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS);
- Caracterizar quantitativamente as amostras de bio-óleos e frações aquosas, provenientes da pirólise de esterco bovino, através da técnica de Espectrometria de Massas com transformada de *Fourier* (FT-MS)

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Fonte de biomassa.

O esterco bovino foi coletado em um sítio de pequeno porte, onde a criação de gado é destinada apenas para o consumo, localizado na zona rural da cidade de Cícero Dantas - Bahia com coordenadas aproximadas de latitude - 10.597708 e longitude - 38.439736.

Após a coleta, a biomassa passou por uma etapa de secagem ao sol durante 15 dias e posteriormente foi triturada em um moinho.

#### 3.2. Pirólise de esterco bovino.

##### 3.2.1 *Conversão da biomassa*

O processo de pirólise foi realizado em um forno de cilindro rotativo, modelo FRO 1100, produzido e adaptado pela empresa ForteLab Ltda. Os parâmetros de operação foram os seguintes: rotação do leito de cilindro rotativo (7,5 rpm), regulagem da vibração do alimentador (80), regulagem do ângulo de decida ( $10^\circ$ ), regulagem da rotação do batedor para delimitar o fluxo de alimentação de biomassa (12 rpm), regulagem do fluxo de gás na alimentação ( $5 \text{ L min}^{-1}$ ), temperatura de pirólise ( $400^\circ\text{C}$ ,  $500^\circ\text{C}$  e  $600^\circ\text{C}$ ) e tempo de carga durante o processo (40 min) [68].

Após a programação dos parâmetros, aproximadamente 500 g de biomassa triturada foi medida em uma balança semi-análítica e adicionada no silo de alimentação. O forno foi programado na temperatura desejada, e um fluxo de ar de  $5 \text{ L min}^{-1}$  foi purgado no interior do reator com o auxílio de uma bomba até alcançar o equilíbrio da temperatura. Em seguida, o fluxo de ar foi substituído pelo fluxo de nitrogênio para garantir uma atmosfera inerte no sistema, mantendo-o durante todo o processo.

Após ajuste dos parâmetros e estabilização da temperatura, a alimentação foi acionada, dando início ao processo de pirólise. O tempo estimado de pirólise foi de 30 minutos, evidenciada pelo encerramento da liberação de gases e fim da alimentação.

Durante o processo o biocarvão foi recolhido na caixa receptora de sólidos na saída do reator, os gases passaram por um condensador a 4 °C onde o bio-óleo foi liquefeito e os gases não condensáveis (bio-gás) foram eliminados. A fração condensada é constituída por duas partes, a fração orgânica (bio-óleo) e a fração aquosa. O bio-óleo foi recuperado do interior do condensador com o auxílio de tetraidrofurano (THF) e a fração aquosa foi recolhida em um recipiente de vidro acoplado ao final do sistema de condensação. O biogás foi succionado com o auxílio de uma bomba a vácuo e liberado. O forno de cilindro rotativo, modelo FRO 1100 é apresentado na Figura 13.

**Figura 13.** Forno rotativo, modelo FRO 1100. **Fonte:** Acervo da autora.



### 3.2.2 Balanço de massa

Os rendimentos das pirólises foram calculados através da razão mássica entre o biocarvão, fração aquosa, bio-óleo produzido e a biomassa utilizada, e o rendimento do biogás foi obtido por diferença. As equações são apresentadas a seguir.

$$\text{Rendimento de bio-óleo (\%m/m)} = \frac{m_{\text{bio-óleo}}}{m_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\text{Rendimento de biocarvão (\%m/m)} = \frac{m \text{ biocarvão}}{m \text{ biomassa}} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\text{Rendimento da fração aquosa (\%m/m)} = \frac{m \text{ fração aquosa}}{m \text{ biomassa}} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\text{Rendimento de biogás (\%)} = [100 - (R_{\text{bio-óleo}} + R_{\text{biocarvão}} + R_{\text{fração aquosa}})] \quad \text{Eq. (4)}$$

### 3.3. Análise da atividade antifúngica.

#### 3.3.1 *Fungos fitopatogênicos.*

As culturas dos fungos *Fusarium solani* e *Lasiodiplodia theobromae* foram obtidas da micoteca do Laboratório de Ecofisiologia e Pós-colheita da Universidade Federal de Sergipe. Os fungos foram armazenados em incubadora tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a temperatura de 25±2 °C.

#### 3.3.2 *Análise de disco-difusão para bio-óleo com 1 a 5% de DMSO.*

O grupo de amostragem foi constituído por seis amostras, sendo três amostras de bio-óleos, produzidos a 400 °C, 500 °C e 600 °C e três amostras das frações aquosas dos respectivos bio-óleos em estudo.

Para os bio-óleos produzidos a 400 °C, 500 °C e 600 °C foi necessário preparar uma solução em dimetilsufóxido (DMSO), com o auxílio de uma balança analítica, 5g da amostra foi pesada em um béquer, dissolvida em aproximadamente 20 mL de DMSO, transferida para um balão volumétrico de 50 mL, aferindo o volume até o traço de referência com DMSO. A concentração final da solução foi de 100 g L<sup>-1</sup>.

As análises foram realizadas incorporando as amostras ao meio de cultura, adotando a técnica descrita por Edgington *et al.* (1971), modificada por Menten *et al.* (1976), que consiste em dissolver a amostra produzida em DMSO e em seguida adicioná-lo ao meio de cultura [76]. As concentrações definidas para o experimento foram de 10 µL mL<sup>-1</sup>, 20 µL mL<sup>-1</sup>, 30 µL mL<sup>-1</sup>, 40 µL mL<sup>-1</sup> e 50 µL mL<sup>-1</sup> (v/v), considerando o volume da solução de bio-óleo adicionado por mL de meio de cultura, Batata Dextrose Agar (*BDA*).

O meio de cultura (BDA-HIMEDIA) foi preparado conforme orientação do fabricante, objetivando um volume de 120 mL de meio de cultura por erlenmeyer, com o auxílio de uma balança semi-análítica, foi pesado 4,68 g do meio de cultura em um erlenmeyer de capacidade para 250 mL, em seguida adicionado o volume de 120 mL de água destilada, após agitação os erlenmeyer foram vedados com papel alumínio e papel Kraft e submetidos a esterilização em autoclave por quinze minutos a uma temperatura de 120 °C.

Após esterilização os erlenmeyers foram agitados e mantidos em estufa a temperatura de 45 °C. Diferentes volumes das soluções de bio-óleo para obtenção das concentrações definidas foram adicionados, e após a homogeneização, 20 mL do meio resultante foi vertido em placas de petri de 90 mm de diâmetro.

Após solidificação do meio de cultura, discos de 10 mm de diâmetro contendo micélios da cultura do fungo foram inoculados com o auxílio de uma alça de platina no centro das placas de petri. Após identificação e vedação as placas foram incubadas na BOD por um período de 72 h para o *Lasiodiplodia theobromae* e 96 h para o *Fusarium solani* a uma temperatura de 25±2 °C e fotoperíodo de 12 h.

A atividade fungistática foi avaliada com base na inibição do crescimento micelial, já a atividade fungicida foi avaliada após a análise descrita anteriormente, onde discos de cada tratamento, em triplicata, foram inoculados em placas de petri contendo apenas o meio de cultura BDA, com avaliação do crescimento micelial após 96 h.

O controle foi realizado inoculando em placas de petri contendo apenas o meio de cultura BDA, discos de 10 mm da cultura do fungo. Nesse experimento também foi realizado o controle do solvente nas mesmas concentrações definidas para as amostras, 10 µL mL<sup>-1</sup>, 20 µL mL<sup>-1</sup>, 30 µL mL<sup>-1</sup>, 40 µL mL<sup>-1</sup> e 50 µL mL<sup>-1</sup> (v/v), que corresponde a 1%, 2%, 3%, 4% e 5%, respectivamente. As placas foram incubadas nas mesmas condições de tempo, temperatura e medição do crescimento micelial. Para o controle de crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* foram utilizadas placas de petri de 150 mm de diâmetro, adicionando o meio até uma espessura de 3 mm que foi observado para as placas com diâmetro de 90 mm.

As avaliações dos crescimentos foram realizadas pela média de duas medidas diametralmente opostas, utilizando-se uma régua milimetrada, as medições foram realizadas de 24 h em 24 h, até o tempo total de incubação de 72 h para o *Lasiodiplodia theobromae* e 96 h para o *Fusarium solani*. O crescimento micelial foi calculado em relação a porcentagem de inibição do crescimento (PIC), de acordo com uma fórmula:

$$\text{PIC (\%)} = \frac{dc-dt}{dc} \times 100 \quad \text{Eq. (5)}$$

Onde:

dc = diâmetro do controle.

dt = diâmetro do tratamento da amostra.

### 3.3.3 Análise de disco-difusão para bio-óleo com DMSO a 1%.

Em virtude da interferência do solvente (DMSO), que tanto pode aumentar a atividade do bio-óleo, quanto agir de forma antagônica com seus componentes impedindo o contato deste com os fungos de estudo, foi necessário realizar novas análises utilizando o solvente na concentração máxima de 1%. Além disso, todas as placas utilizadas tinham diâmetro de 150 mm em virtude do crescimento rápido do fungo *Lasiodiplodia theobromae*.

Para os bio-óleos produzidos a 400 °C, 500 °C e 600 °C foram preparadas soluções nas concentrações de 100 g L<sup>-1</sup>, 200 g L<sup>-1</sup>, 300 g L<sup>-1</sup>, 400 g L<sup>-1</sup>, e 500 g L<sup>-1</sup>, a fim de reduzir o volume de solvente e manter as concentrações definidas anteriormente. Com o auxílio de uma balança analítica, 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 e 2,5 g das amostras foram medidas em béqueres, dissolvida em aproximadamente 2 mL de DMSO, transferida para balões volumétricos de 5 mL, aferindo o volume até o traço de referência com DMSO. Para as frações aquosas não foi necessário preparar soluções e nem adicionar DMSO, adicionando apenas os volumes para obtenção das concentrações definidas.

O meio de cultura (BDA-HIMEDIA) foi preparado conforme orientação do fabricante, objetivando um volume de 240 mL de meio de cultura por erlenmeyer, com o auxílio de uma balança semi-análítica, foi pesado 9,36 g do meio de cultura em um erlenmeyer de capacidade para 500 mL, em seguida adicionado o volume de 240 mL de água destilada, após agitação os erlenmeyer foram vedados com papel alumínio e papel Kraft e submetidos a esterilização em autoclave por quinze minutos a uma temperatura de 121 °C.

Após esterilização os erlenmeyers foram agitados e mantidos em estufa a temperatura de 45 °C. Com o auxílio de uma pipeta graduada 2,4 mL das soluções de bio-óleos foram adicionadas nos erlenmeyers para obtenção das concentrações definidas, e após a homogeneização, 40 mL do meio resultante foi vertido em placas de petri com 150 mm de diâmetro.

Após solidificação do meio de cultura, discos de 8 mm de diâmetro contendo micélios da cultura do fungo foram inoculados com o auxílio de uma alça de platina no centro das placas de petri. Após identificação e vedação as placas foram incubadas na BOD por um período de 72 h para o *Lasiodiplodia theobromae* e 96 h para o *Fusarium solani* a uma temperatura de 25±2 °C e fotoperíodo de 12h.

Os resultados foram analisados através do programa Excel®, obtendo a média, os desvios padrões entre as medidas e a porcentagem de inibição do crescimento. A análise de regressão linear para a concentração que inibiu 50% (IC<sub>50</sub>) do crescimento micelial do fungo foi estimada através do programa GraphPad Prisma® a partir de equações geradas, e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

### **3.4 Caracterização da fração líquida da pirólise esterco bovino**

Os bio-óleos obtidos foram caracterizados por Análise Elementar (CHN), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de *Fourier* (FTIR), Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS) e Espectrometria de Massas de ultra alta resolução (FT-MS). Para as frações aquosas foram realizadas análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS) e Espectrometria de Massas de ultra alta resolução (FT-MS)

### 3.4.1 *Análise Elementar (CHN) para os bio-óleos.*

A análise elementar foi realizada em um equipamento LECO CHN628 e os resultados tratados em software CHN628 versão 1.30. O equipamento foi operado com o Hélio (99,995%) e oxigênio (99,99%), com temperatura do forno a 950 °C e a temperatura do *Afterburner* a 850 °C.

O equipamento foi calibrado com padrão de EDTA (41,0% de C, 5,5% de H e 9,5% de N), construindo uma curva de calibração com intervalo de massa entre 10-200 mg. Aproximadamente 50 mg das amostras foram suportadas em reagente para amostras líquidas, utilizando uma folha de estanho. O padrão e as amostras foram analisados em uma folha de estanho.

O teor de oxigênio foi obtido por diferença conforme equação abaixo:

$$\% O = [100 - (\%C + \%H + \%N)] \quad \text{Eq. (6)}$$

Onde,

%C = teor de carbono;

%H = teor de hidrogênio;

%N = teor de nitrogênio;

O teor de oxigênio foi calculado por diferença, desconsiderando o teor de cinzas, pois os bio-óleos geralmente apresentam baixo conteúdo de cinzas, variando de 0 - 0,2% [68].

### 3.4.2 *Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para os bio-óleos.*

A análise de espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi realizada em um espectrofotômetro da marca Varian, modelo 640-IR, nas seguintes condições: intervalo de varredura 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , resolução 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 *scans*  $\text{min}^{-1}$ . As amostras foram maceradas em KBr e prensadas para a obtenção de uma pastilha e posteriormente submetida a análise [77].



### 3.4.3 Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS) para os bio-óleos.

Dos bio-óleos obtidos do processo de pirólise em forno rotativo, foram preparadas soluções na concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  em THF, previamente destilado para remoção de interferentes. Após preparo das soluções, as mesmas foram submetidas a um processo de derivatização, utilizando N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA). O objetivo foi transformar os componentes das amostras em compostos menos polar, aumentando dessa forma a detectabilidade dos analitos. Um volume de  $30 \text{ }\mu\text{L}$  do agente derivatizante (BSTFA) juntamente com  $70 \text{ }\mu\text{L}$  da solução de bio-óleo em THF foram transferidos para um frasco amostrador com o auxílio de uma microseringa.

As soluções foram homogeneizadas em um agitador tipo vortex por 30 segundos e posteriormente submetidas a uma temperatura de  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos em estufa. Em seguida foi realizada a análise por GC/MS. As análises das soluções de bio-óleos foram realizadas em GC/MS da marca Shimadzu, modelo GC-2010Plus, espectrômetro de massas modelo TQ-8040, injetor AOC5000Plus. O corte do solvente foi ajustado em 10 minutos. As condições de análise foram estabelecidas utilizando como referência a metodologia de Santana, K. V. R. (2017) [68], que estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Condições cromatográficas de análise no GC/MS.

Parâmetros	GC/MS
Coluna	Rtx-5MS (5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano)
Dimensões da coluna	$30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$
Programação da rampa de aquecimento	$50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (5,0 min); $5 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (7,0 min); $10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (5,0 min)
Gás de arraste e fluxo	He, fluxo constante de $1,20 \text{ mL min}^{-1}$
Volume de injeção / Split	$1,0 \text{ }\mu\text{L}$ / 1:10
Temperatura do injetor	$280 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Temperatura da interface	$300 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Faixa de massas ( $m/z$ )	40-550 Daltons

*Continua...*

*Continuação da tabela 3...*

Ionização por elétrons	70 eV
Tempo de análise	53 min

#### 3.4.4 *Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS) para as Frações Aquosas.*

Para análise da fração aquosa, foi realizada a extração líquido-líquido e pré-concentração das amostras utilizando solvente com polaridades diferentes, como o diclorometano e o hexano.

Em funil de separação foram adicionados com o auxílio de uma pipeta volumétrica 5 mL da fração aquosa, em seguida foram adicionados três volumes sucessivos de 0,5 mL do solvente, sendo o funil agitado a cada adição, abrindo a torneira para alívio da pressão, posteriormente foram adicionados 3,5 mL do solvente, obtendo um volume final de 5 mL.

Após agitação final e separação das fases, a fase orgânica foi recolhida em um béquer e submetida a uma filtração simples, utilizando lã de vidro e uma camada de aproximadamente 5 mm de sulfato de sódio anidro, sendo a mostra recolhida em um balão de fundo redondo de 250 mL. O balão foi conectado ao sistema de rotaevaporação, sendo o solvente totalmente evaporado, posteriormente foi adicionado 1 mL de THF, que após agitação no balão foi transferido para frasco de vidro.

A fração extraída com DCM foi submetida a diluição com o auxílio de uma microseringa 100 µL da solução foi transferida para um balão de 1000 µL, sendo aferido o volume até o traço de aferição com THF.

As soluções resultantes das frações aquosas extraídas em hexano e diclorometano foram submetidas a um processo de derivatização com BSTFA, utilizando um volume de 30 µL do agente derivatizante (BSTFA) com 70 µL da solução de bio-óleo em THF foram transferidos para um frasco amostrador com o auxílio de uma microseringa.

As soluções foram homogeneizadas em um agitador tipo vortex por 30 segundos e posteriormente submetidas a uma temperatura de 60 °C durante

30 minutos em estufa. As amostras foram analisadas nas mesmas condições cromatográficas para o bio-óleo, a única variável foi para as soluções extraídas com DCM, onde foi aumentado o *split* em 1:50.

#### 3.4.5 *Análise por Espectrometria de Massas com transformada de Fourier (FT-MS) para os bio-óleos e frações aquosas.*

As amostras foram analisadas por espectrometria de massas empregando ionização por *electrospray* (ESI(±)-FTMS). Para as análises foram preparadas soluções dissolvendo 1000 µg da amostra em um balão volumétrico de 1000 µL, utilizando como solvente uma solução de tolueno/metanol (1:1 v/v). Em seguida, uma alíquota de 20 µL desta solução foi diluída a um volume final de 1000 µL, utilizando a mesma mistura de solventes, resultando em uma solução de 20 ppm. O procedimento de preparo de solução foi adotado para análise por ionização nos modos ESI (+) e ESI (-).

Os dados foram obtidos por ESI-FTMS em um espectrômetro de massas Exactive Plus HCD (Thermo Scientific, Bremen, Germany) para a análise as seguintes condições foram definidas: voltagens do capilar em +4,4 e – 3,0 kV, nível do *S-lens* em 50 e temperatura do capilar em 320 °C. O gás de nebulização utilizado foi o nitrogênio. A aquisição foi operada no modo *full scan* com uma resolução de 140.000 *FWHM* em *m/z* 200 ao longo do intervalo *m/z* de 100-1000 Da usando o software Xcalibur 3.0 e um total de 100 *scans* foram acumulados em cada corrida.

O espectro de massas final para cada amostra foi obtido da subtração do espectro de massas do branco. A atribuição de fórmula molecular dos íons obtidos por ESI(±)-FTMS foram obtidas através do software PetroMS. A atribuição da fórmula molecular foi considerada quando o erro da massa entre o *m/z* experimental e o *m/z* teórico foi menor que 3 ppm.

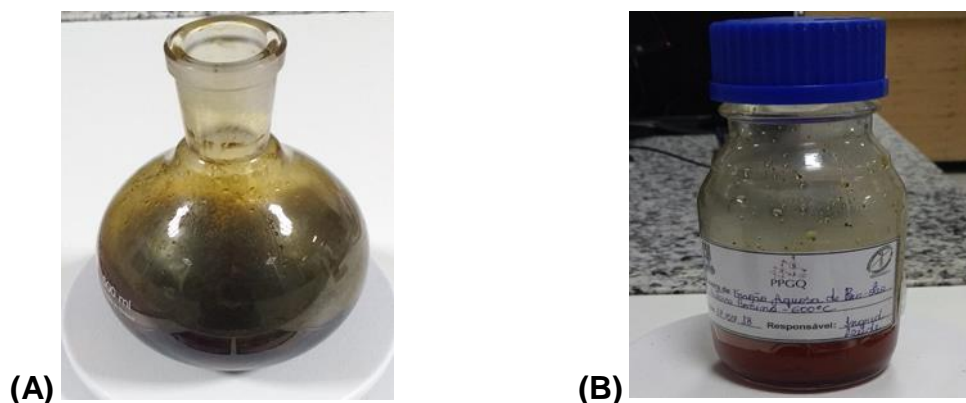
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Rendimentos dos produtos da pirólise

O parâmetro variável no processo de pirólise foi a temperatura, os demais mantiveram-se constantes para os três experimentos. Os bio-óleos apresentaram uma coloração marrom escura, baixa viscosidade e um odor característico de fumaça, esta última característica também foi evidenciada nas frações aquosas. Na Figura 14 são apresentadas frações líquidas da pirólise (bio-óleo e fração aquosa) produzidos no reator de forno rotativo FRO 1100. Os rendimentos dos produtos da pirólise nas três temperaturas de estudo estão apresentados na

Tabela 4.

**Figura 14.** A imagem **(A)** corresponde ao bio-óleo e a figura **(B)** a fração aquosa. **Fonte:** Acervo da autora.



**Tabela 4.** Rendimentos (% *m/m*) dos produtos da pirólise de esterco bovino.

	400 °C	500 °C	600 °C
<b>Biocarvão (%)</b>	44,25	41,58	46,02
<b>Fase aquosa (%)</b>	24,76	24,75	17,73
<b>Bio-óleo (%)</b>	7,60	8,32	6,57
<b>Biogás* (%)</b>	23,39	25,35	28,68

\* Valor obtido por diferença.

O esperado é obter um máximo rendimento do biocarvão em temperaturas inferiores, ou seja, na temperatura de pirólise a 400 °C. Pois esse valor é atribuído principalmente à decomposição incompleta da biomassa em baixas temperaturas [50,54]. Entretanto podemos observar que o processo a 600 °C apresentou uma maior porcentagem de biocarvão, consequentemente um rendimento menor de bio-óleo e fração aquosa, sendo o rendimento da fração aquosa o menor das três temperaturas de pirólise.

Os rendimentos da fração aquosa e sólida deveriam apresentar uma diferença significativa com o aumento da temperatura de pirólise. Segundo estudo realizado por Vieira *et al.*, (2014) [56], o rendimento da fração aquosa aumenta, enquanto que o da fração sólida diminuiu com o aumento da temperatura.

A diminuição do rendimento do biocarvão é atribuído a um aumento de volatilização dos hidrocarbonetos sólidos ou a uma possível gaseificação parcial do resíduo de carbono. Já o aumento de rendimento da fração aquosa foi em virtude de uma maior quebra dos grupos funcionais dos compostos voláteis, durante as reações secundárias [56], assim na temperatura de 600 °C deveria ocorrer uma maior formação de fração aquosa e menor de biocarvão.

Apenas o produto gasoso não sofreu influência, e o aumento da temperatura de pirólise resultou no aumento do rendimento do produto. Tal aumento ocorreu devido às reações de craqueamento secundárias dos vapores da pirólise em temperaturas elevadas [50,55].

Comparando os resultados deste trabalho com os apresentados por Santana (2017) [68], apresentados na Tabela 5. O rendimento máximo do sólido foi obtido na menor temperatura de pirólise, o que corresponde a 62,5% de biocarvão a 400 °C e um efeito inverso para o biogás, que teve um aumento significativo a temperatura de 600 °C. A fração líquida teve um melhor rendimento na temperatura de 500 °C e foi evidenciado também uma maior produção de bio-óleo. Neste sentido a autora afirma com base em resultados da literatura que a temperatura de 500 °C é a temperatura ótima de pirólise, pois há um menor consumo de energia e um maior rendimento de produtos líquidos.

**Tabela 5.** Distribuição dos produtos da pirólise em *scale-up* do esterco bovino.**Fonte:** Santana (2017) [68].

	400 °C	500 °C	600 °C
<b>Biocarvão (%)</b>	62,5	50,8	39,1
<b>Fração aquosa (%)</b>	21,6	34,4	21,7
<b>Bio-óleo (%)</b>	3,4	5,8	4,7
<b>Biogás* (%)</b>	12,5	9,0	34,5

\* Valor obtido por diferença.

Apesar dos resultados inversos para a fração aquosa e biocarvão, a temperatura de 500 °C também forneceu um melhor rendimento da fração líquida, no que se refere ao bio-óleo e fração aquosa, porém foi obtido um maior rendimento na produção de bio-óleo, o menor rendimento deste estudo que foi de 6,57% ainda é superior ao maior rendimento obtido no estudo realizado por Santana (2017), que foi de 5,8%. As pirólises deste estudo foram realizadas utilizando o mesmo equipamento do estudo proposto por Santana (2017).

O rendimento maior deste estudo está associado a fonte da biomassa, visto que a composição lignocelulósica é variável, cada material apresenta uma característica particular, devido as proporções dos componentes que o constitui, que levará a diferentes produtos no processo de pirólise [68]. A Tabela 6 apresenta a variação da composição lignocelulósica para diferentes fontes de biomassa de esterco bovino.

**Tabela 6.** Teor de hemicelulose, celulose e lignina para diferentes fontes de esterco bovino. **Fonte:** Adaptada de Santana, K. V. R. (2017) [68].

<b>Análise</b>	<b>Santana, 2017</b>	<b>Xu e Chen, 2013</b>
<b>Hemicelulose (%)</b>	18,24	23,48
<b>Celulose (%)</b>	14,24	9,96
<b>Lignina (%)</b>	6,09	10,18

Os fatores que podem influenciar a composição estão relacionados a variáveis no sistema de criação do gado, tais como: raça, idade, sistema nutricional, disponibilidade de água, condições ambientais, entre outros. Este tem influência direta na quantidade de esterco produzido por animal e na composição química, alterando desta forma as características finais do esterco [56].

## 4.2 Avaliação da Atividade Antifúngica

### 4.2.1 Influência do solvente no crescimento dos fungos

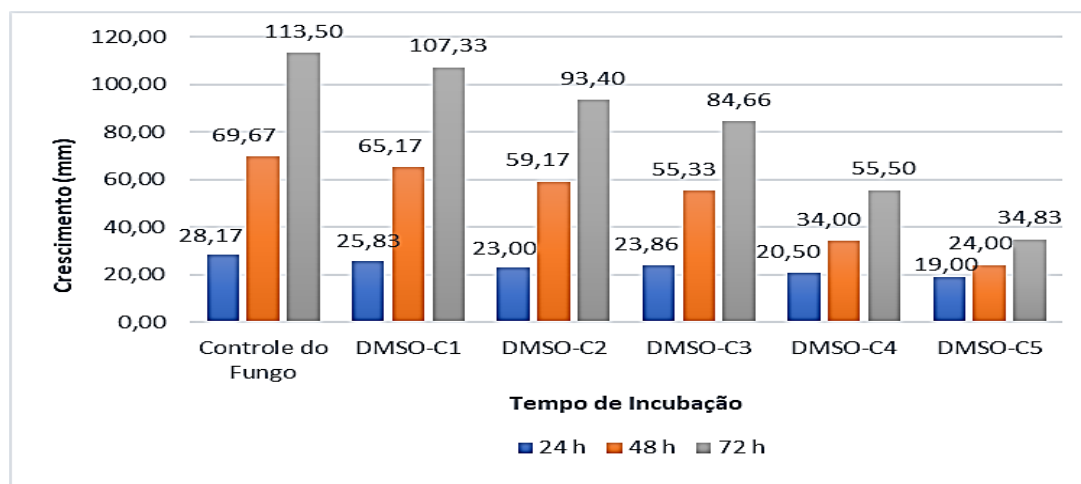
Neste trabalho, a fim de evidenciar as possíveis interferências do solvente nas análises e no crescimento dos fungos, além da atividade antifúngica para as amostras de bio-óleo, foi realizado o controle de solventes nas mesmas concentrações para as amostras em estudo. A Tabela 7 apresenta a porcentagem de inibição do crescimento dos fungos frente ao solvente DMSO (nesta tabela não é retirado o valor inicial do disco contendo micélios do fungo).

**Tabela 7.** Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) dos fungos frente ao solvente DMSO variando a concentração de 1 a 5%.

	PIC (%)				
	DMSO-C1	DMSO-C2	DMSO-C3	DMSO-C4	DMSO-C5
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	5,96	19,42	27,86	46,38	66,35
<i>Fusarium solani</i>	2,76	4,73	38,23	37,60	38,90

Devido ao crescimento rápido do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, apenas foi possível realizar medidas até as 72 h de incubação. A Figura 15 apresenta o controle de crescimento do fungo apenas em meio de cultura *BDA* e em diferentes concentrações de DMSO para a avaliação da possível interferência do solvente. À medida que a concentração do solvente aumenta no meio de cultura há uma diminuição do crescimento micelial do fungo.

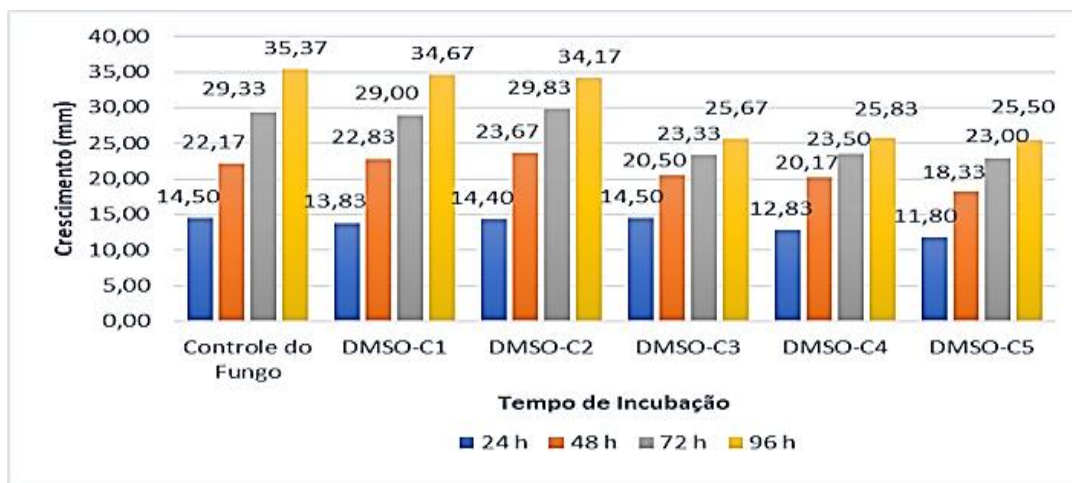
**Figura 15.** Controle de crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* e interferência do DMSO variando a concentração de 1 a 5%.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

A avaliação do crescimento para o *Fusarium solani* ocorreu após 96 h de incubação, diferente do *Lasiodiplodia theobromae*, este fungo apresentou uma taxa de crescimento micelial mais lenta. A Figura 16 apresenta o controle de crescimento do fungo apenas em meio de cultura BDA e em diferentes concentrações de DMSO para a avaliação da possível interferência do solvente.

**Figura 16.** Controle de crescimento do fungo *Fusarium solani* e interferência do DMSO variando a concentração de 1 a 5%.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).



A interferência do solvente para *Fusarium solani* foi menos acentuada em relação ao fungo descrito anteriormente. Para as concentrações DMSO-C1 e DMSO-C2 podemos observar que a inibição do crescimento foi mínima em relação ao controle, há um aumento brusco da inibição do crescimento de DMSO-C2 para DMSO-C3, mas as concentrações DMSO-C3, DMSO-C4 e DMSO-C5 não apresentaram diferenças significativas entre elas devido ao aumento da concentração do solvente.

#### 4.2.2 Avaliação da Atividade Antifúngica dos bio-óleos variando a concentração de DMSO de 1 a 5%.

Em virtude da possibilidade de avaliação do controle de crescimento do *Lasiodiplodia theobromae* apenas até 72 h de incubação, as amostras também tiveram seu crescimento avaliado nesse mesmo período. Para uma melhor visualização e discussão, os resultados serão apresentados da seguinte forma, primeiro uma tabela contendo a porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente aos bio-óleos, seguido da figura da avaliação do crescimento em função do tempo de incubação (nesta tabela não é retirado o valor inicial do disco contendo micélios do fungo). A Tabela 8 apresenta a porcentagem de inibição do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente aos bio-óleos.

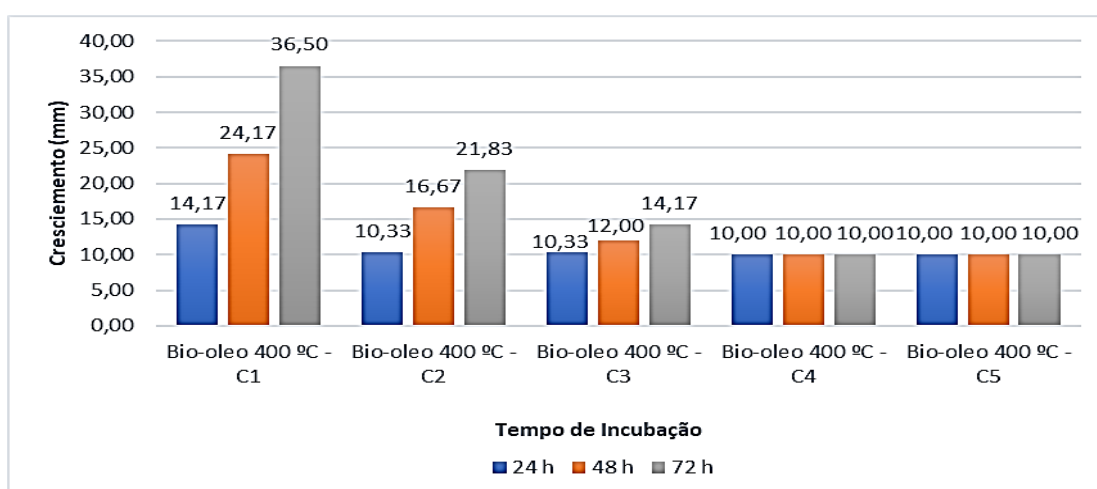
**Tabela 8.** Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente aos bio-óleos.

Amostra	Tempo de análise	PIC (%)				
		C1	C2	C3	C4	C5
Bio-óleo 400 °C	72 h	74,40	88,57	95,97	100,00	100,00
Bio-óleo 500 °C		68,92	83,89	93,40	96,78	97,75
Bio-óleo 600 °C		81,16	92,27	97,40	100,00	100,00

O bio-óleo produzido a 400 °C apresentou inibição do crescimento micelial de C1 = 74,40%, C2 = 88,57%, C3 = 95,97% e em C4 100%, respectivamente, para a interferência do solvente os valores encontrados foram 5,96%, 19,42%, 27,86% e 46,38%. Entretanto, avaliando a concentração C1, onde temos a menor interferência do solvente e menor concentração da amostra, é possível notar que o bio-óleo apresenta potencial fungistático, e provavelmente a medida que a concentração aumenta, esse potencial tende a aumentar.

Após o tempo de incubação para determinação do potencial fungistático, discos foram transferidos para placas de petri contendo apenas o meio de cultura *BDA*, em todas as concentrações ocorreram crescimento do fungo, portanto, nas concentrações de estudo o bio-óleo não apresentou potencial fungicida. A Figura 17 apresenta a avaliação do crescimento do fungo em função do tempo de incubação para o bio-óleo produzido a 400 °C.

**Figura 17.** Avaliação do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente ao bio-óleo produzido a 400 °C.



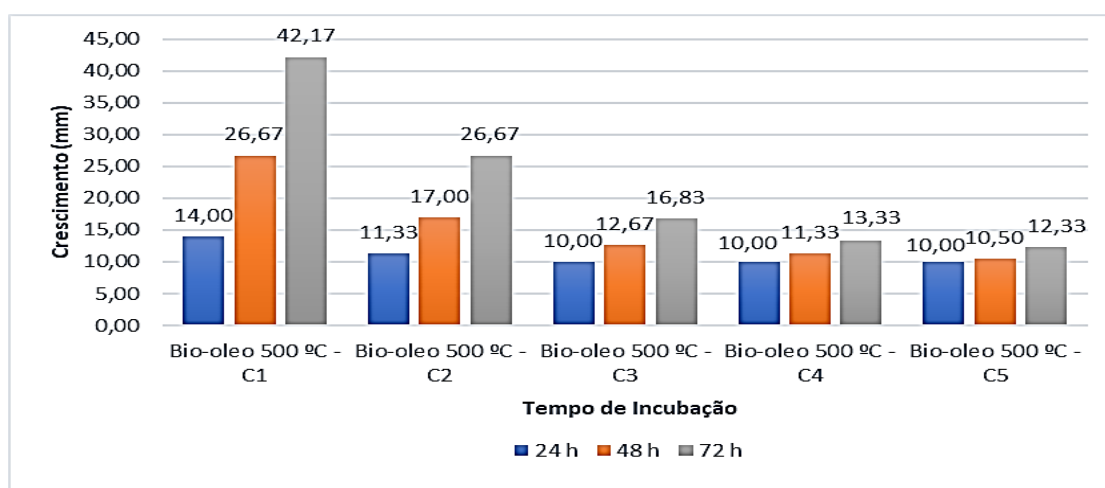
C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (*BDA*).

O bio-óleo produzido a 500 °C apresentou potencial fungistático, entretanto, em relação ao bio-óleo discutido anteriormente ele possui um potencial menor, na maior concentração de estudo C5 foi obtido apenas 97,75% de inibição do crescimento, enquanto que na concentração C4 do bio-óleo produzido a 400 °C foi obtido 100% de inibição, o resultado também foi

menor na concentração C1 que constitui a margem de segurança para a utilização do DMSO.

Após o tempo de incubação para determinação do potencial fungistático, discos foram transferidos para placas de petri contendo apenas o meio de cultura *BDA* e o bio-óleo não apresentou potencial fungicida. A Figura 18 apresenta a avaliação do crescimento do fungo em função do tempo de incubação para o bio-óleo produzido a 500 °C.

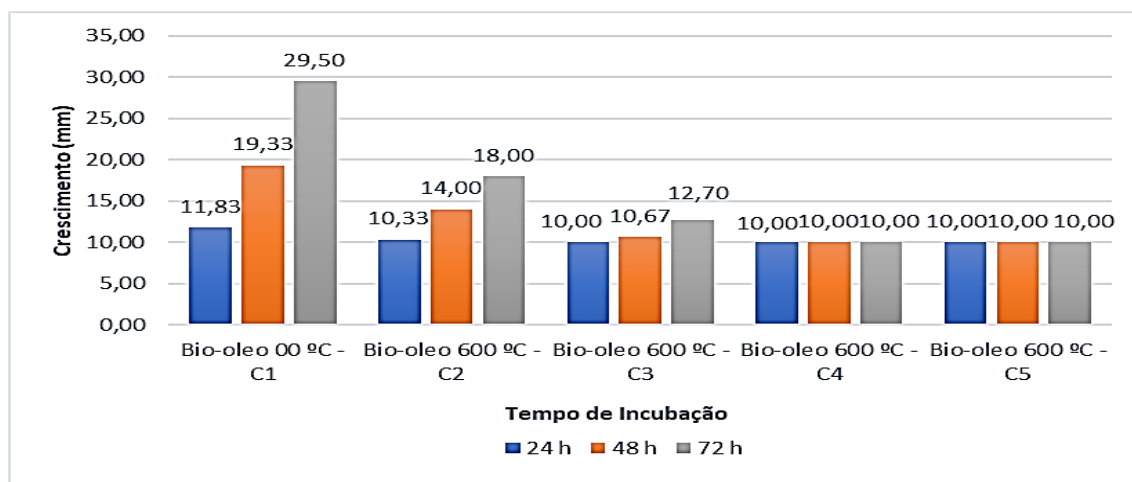
**Figura 18.** Avaliação do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente ao bio-óleo produzido a 500 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (*BDA*).

Diante dos resultados evidenciados para os bio-óleos a 400 °C, 500 °C e 600 °C, obtendo na concentração C1, 74,40%, 68,92% e 81,16% de inibição do crescimento, respectivamente, o bio-óleo produzido a 600 °C apresenta um maior potencial fungistático e em C3 atinge quase 100% de inibição. Podemos concluir que este teve melhor ação de inibição do crescimento. Após o tempo de incubação para determinação do potencial fungistático, disco foram transferidos para placas de petri contendo apenas o meio de cultura *BDA*, o bio-óleo não apresentou potencial fungicida. A Figura 19 apresenta a avaliação do crescimento do fungo em função do tempo de incubação para o bio-óleo produzido a 600 °C.

**Figura 19.** Avaliação do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente ao bio-óleo produzido a 600 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

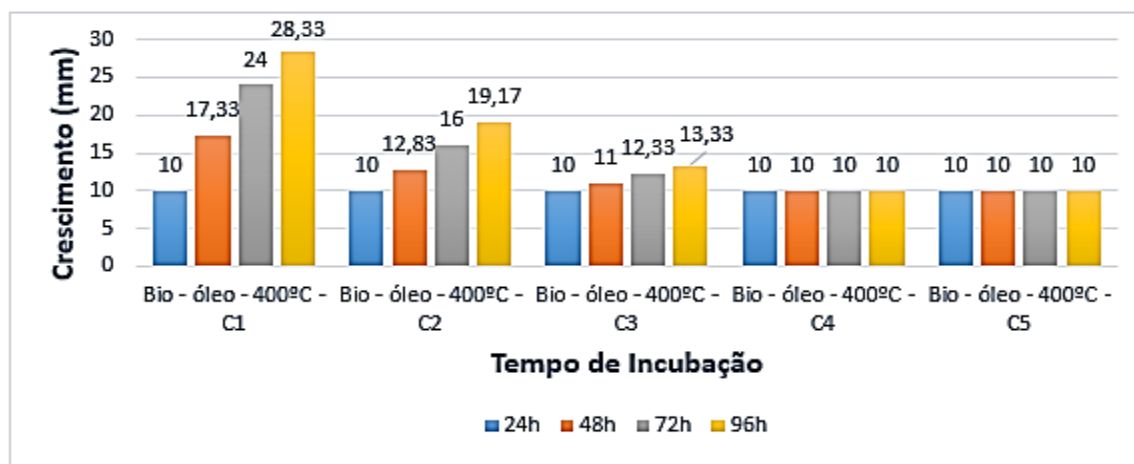
Considerando os diferentes mecanismos de ação e meios de proteção ou resistência dos fungos, este estudo se propôs a comparar a ação das amostras para dois fungos fitopatogênicos. A Tabela 9 apresenta a porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Fusarium solani* frente aos bio-óleos.

**Tabela 9.** Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo *Fusarium solani* frente aos bio-óleos.

Amostra	Tempo de análise	PIC (%)				
		C1	C2	C3	C4	C5
Bio-óleo 400 °C	96 h	27,75%	63,85%	86,87%	100,00%	100,00%
Bio-óleo 500 °C		35,63%	59,91%	82,26%	89,48%	100,00%
Bio-óleo 600 °C		48,76%	81,59%	100,00%	100,00%	100,00%

Para o bio-óleo produzido a 400 °C, na concentração C4 foi obtido um potencial fungistático de 100%, a Figura 20 a seguir evidencia o comportamento do crescimento ao longo do período de incubação.

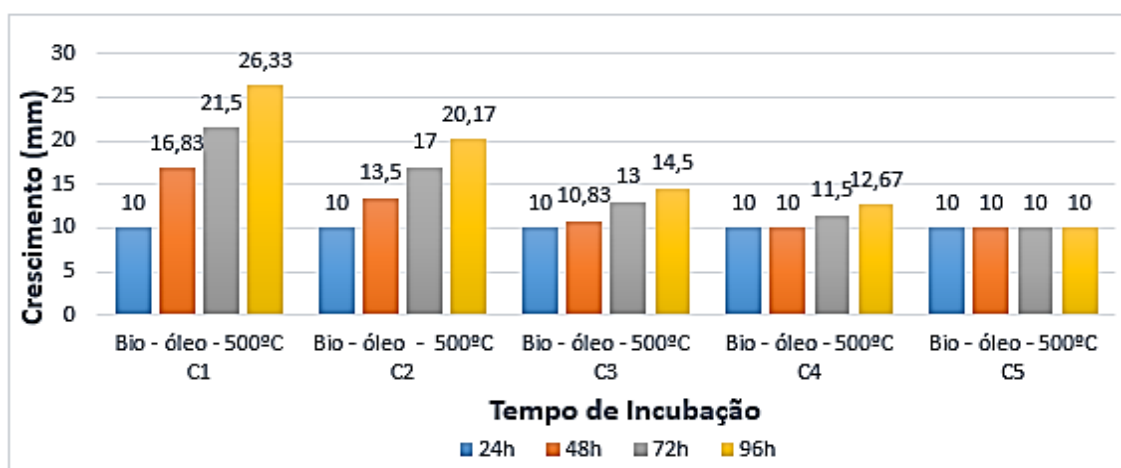
**Figura 20.** Avaliação do crescimento do fungo *Fusarium solani* frente ao bio-óleo produzido a 400 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

O bio-óleo produzido a 500 °C frente ao fungo *Fusarium solani* apresentou um menor potencial de inibição, obtendo o valor de 100% apenas na concentração C5, assim como o menor potencial apresentado para o *Lasiodiplodia theobromae*. A avaliação do crescimento é apresentada na Figura 21.

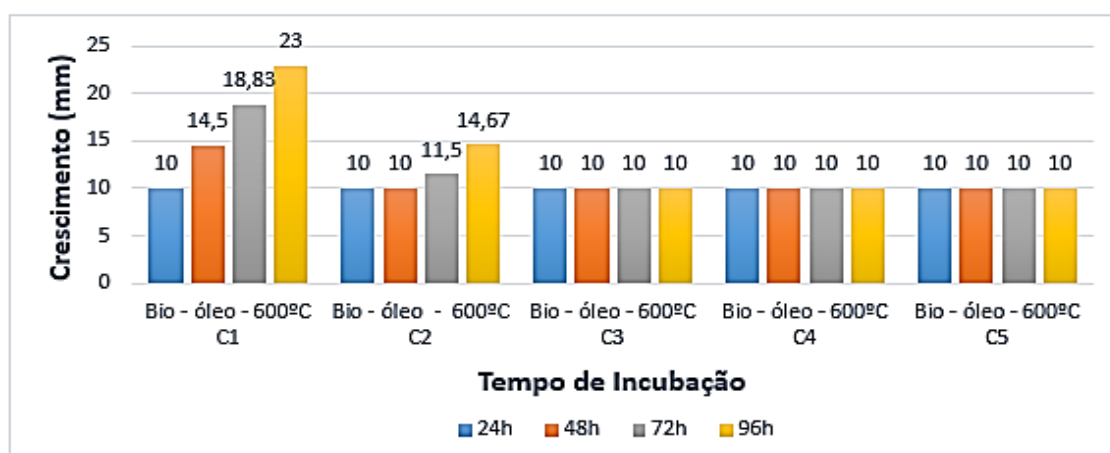
**Figura 21.** Avaliação do crescimento do fungo *Fusarium solani* frente ao bio-óleo produzido a 500 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

Da mesma forma que os resultados para o *Lasiodiplodia theobromae*, o bio-óleo produzido a 600 °C apresentou melhores resultados quanto ao potencial fungistático, além disso na concentração C5 apresentou ação fungicida para o *Fusarium solani*. A Figura 22 apresenta a avaliação do crescimento do fungo *Fusarium solani* frente ao bio-óleo produzido a 600 °C.

**Figura 22.** Avaliação do crescimento do fungo *Fusarium solani* frente ao bio-óleo produzido a 600 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

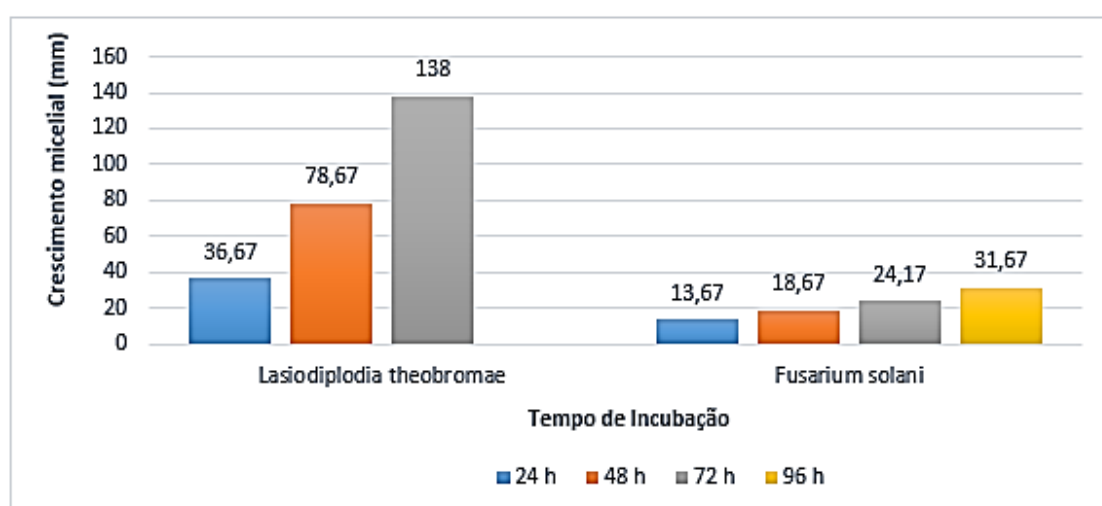
O DMSO possui extrema capacidade de penetração e difusão, e por esse motivo é utilizado como veículo componente de defensivos agrícolas [76]. Essa ação permeante de membranas celulares permite sua utilização como potencializador de drogas antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias, otimizando o mecanismo de ação e resultando no incremento da sensibilidade do agente [62].

Entretanto, alguns resultados alertam também para a limitação da utilização do DMSO em virtude da possível redução da atividade de algumas substâncias [62]. Desta forma a redução para uma concentração final do solvente a 1% podem minimizar a ação do solvente e conferir resultados confiáveis da atividade antifúngica das amostras em estudo.

#### 4.2.3. Avaliação da atividade antifúngica dos bio-óleos frente aos fungos com DMSO a 1%.

Nesse experimento foi realizado um novo controle de crescimento dos fungos para o cálculo da porcentagem de inibição. A Figura 23 apresenta o crescimento micelial por tempo de incubação para *Fusarium solani* e *Lasiodiplodia theobromae*.

**Figura 23.** Controle de crescimento dos fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium solani*.



##### 4.2.3.1 Avaliação da atividade antifúngica dos bio-óleos frente ao *Lasiodiplodia theobromae* com 1% de DMSO.

Partindo dos resultados da apresentada a seguir foi possível observar que a medida em que se aumenta a concentração do bio-óleo no meio de cultura há um aumento da inibição do crescimento para todas as amostras, sendo que o bio-óleo produzido a 600 °C apresentou melhores resultados de inibição.

Comparando com os resultados obtidos com a adição de DMSO de 1 a 5 % foi possível evidenciar uma redução do potencial de inibição, nenhuma das concentrações apresentou um potencial fungistático de 100% e as amostras também não apresentam ação fungicida nas concentrações de estudo. Desta forma, o aumento da concentração de DMSO nas amostras proporcionaram um

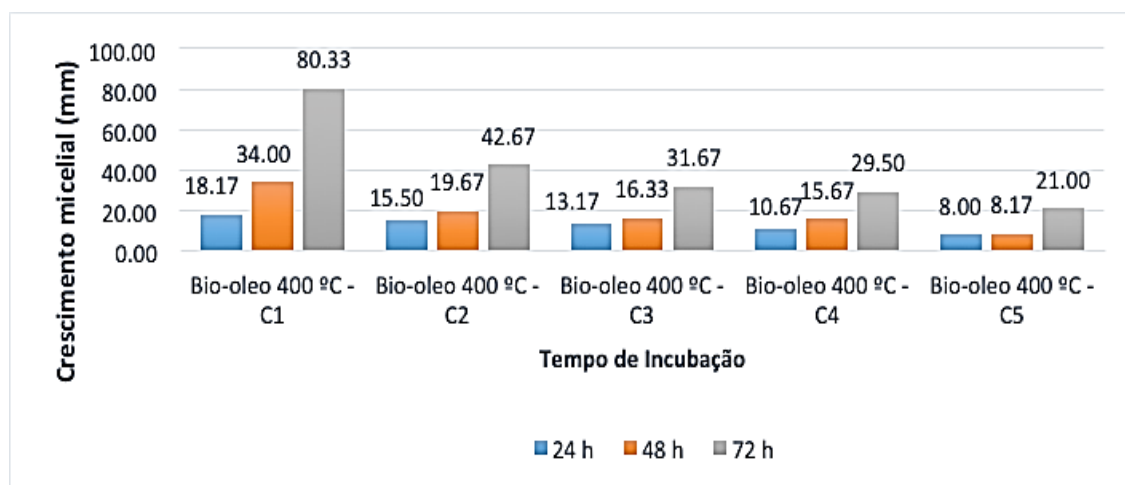
aumento da atividade. A Tabela 10 apresenta a porcentagem de inibição do crescimento do *Lasiodiplodia theobromae* frente aos bio-óleos.

**Tabela 10.** Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente aos bio-óleos contendo 1% de DMSO.

Amostra	Tempo de análise	PIC (%)				
		C1	C2	C3	C4	C5
Bio-óleo 400 °C	72 h	44,36	73,33	81,80	83,38	90,00
Bio-óleo 500 °C		47,14	73,85	81,15	91,41	92,31
Bio-óleo 600 °C		47,18	76,54	89,36	93,59	95,26

As Figuras 24, 25 e 26 apresentam respectivamente a inibição do crescimento micelial dos bio-óleos produzidos a 400, 500 e 600 °C em função do tempo de incubação do *Lasiodiplodia theobromae*.

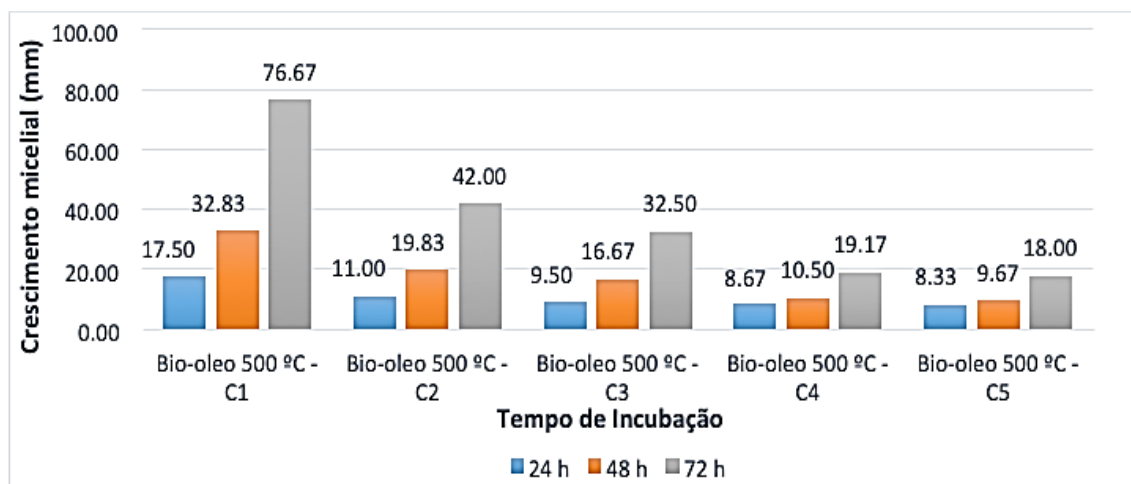
**Figura 24.** Avaliação do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente ao bio-óleo produzido a 400 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

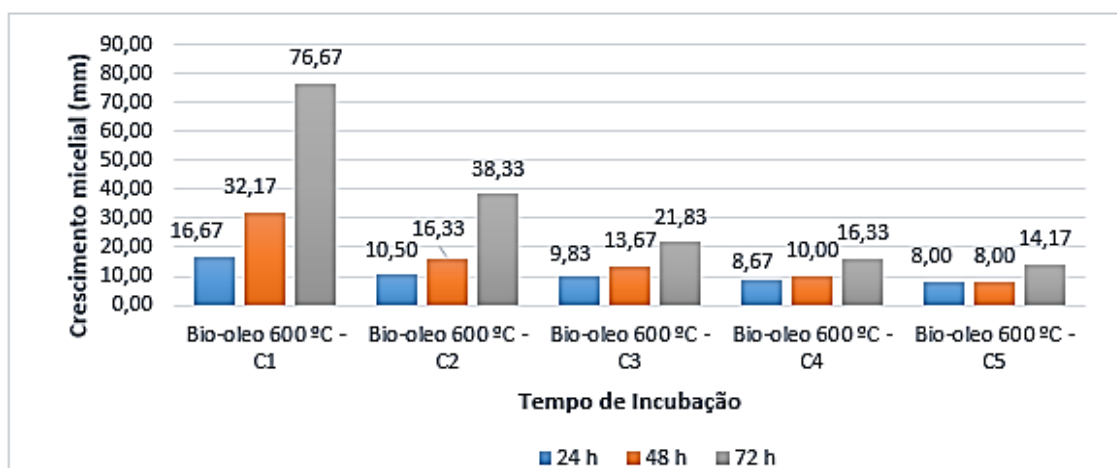


**Figura 25.** Avaliação do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente ao bio-óleo produzido a 500 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

**Figura 26.** Avaliação do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente ao bio-óleo produzido a 600 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

#### 4.2.3.2 Avaliação da atividade antifúngica dos bio-óleos frente ao *Fusarium solani* com 1% de DMSO.

A Tabela 11 apresenta as respectivas porcentagens de inibição para os bio-óleos. Diante dos resultados apresentados, podemos observar que ocorreu para o bio-óleo frente ao *Fusarium solani* também uma redução do seu

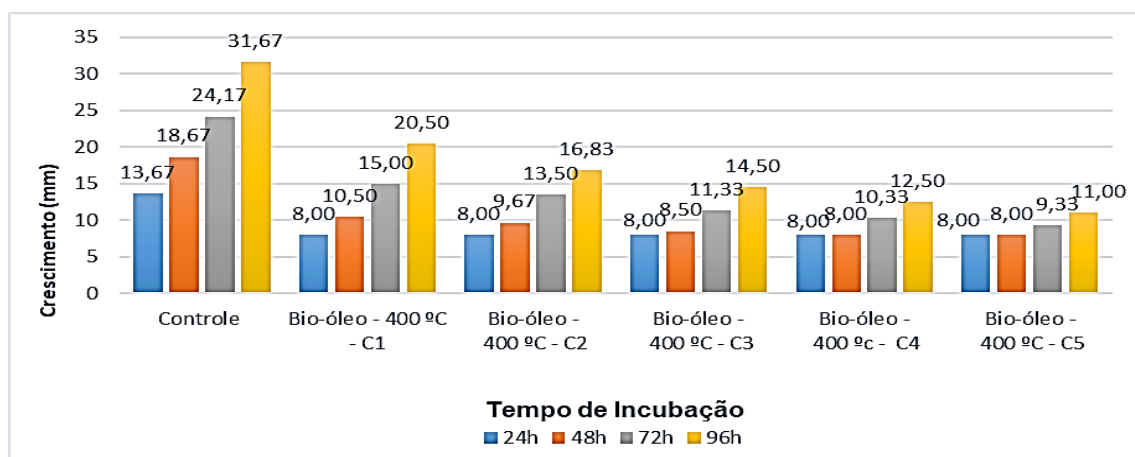
potencial fungistático, não apresentando também ação fungicida nas concentrações de estudo.

**Tabela 11.** Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo *Fusarium solani* frente aos bio-óleos contendo apenas 1% de DMSO.

Amostra	Tempo de análise	PIC (%)				
		C1	C2	C3	C4	C5
Bio-óleo 400 °C	96 h	46,81	66,67	72,34	80,85	87,23
Bio-óleo 500 °C		44,68	62,41	73,76	86,52	91,49
Bio-óleo 600 °C		38,30	65,96	75,18	90,78,00	100,00

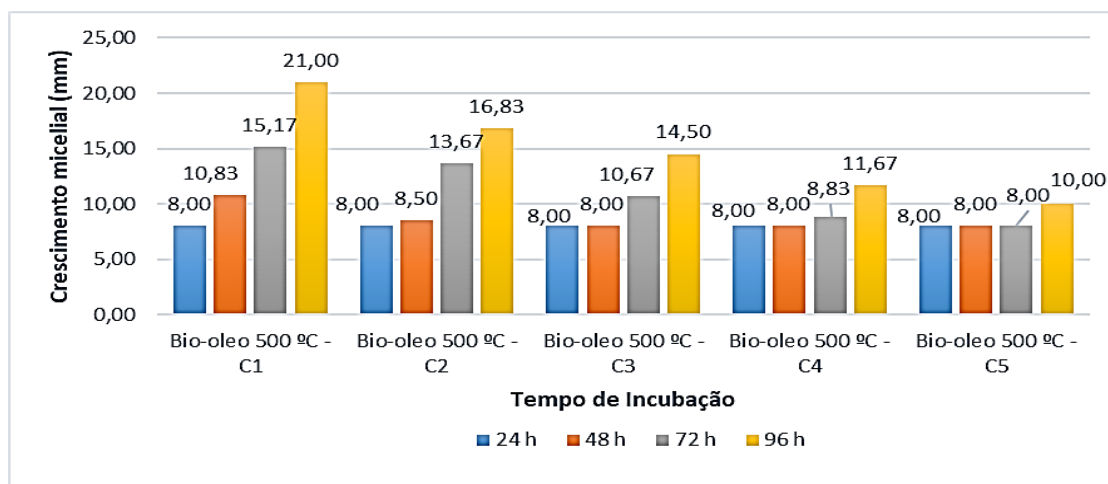
O bio-óleo produzido a 500 °C variando de 1 a 5% a concentração de DMSO apresentou para ambos os fungos menores potencial fungistático, entretanto, as análises com apenas 1% de DMSO, seguem uma tendência diferente, gradativamente a medida em que se aumenta a temperatura de pirólise há um aumento no potencial de inibição. As Figuras 27, 28 e 29 a seguir apresentam respectivamente a inibição do crescimento micelial dos bio-óleos produzidos a 400, 500 e 600 °C em função do tempo de incubação do *Fusarium solani*.

**Figura 27.** Avaliação do crescimento do fungo *Fusarium solani* frente ao bio-óleo produzido a 400 °C.



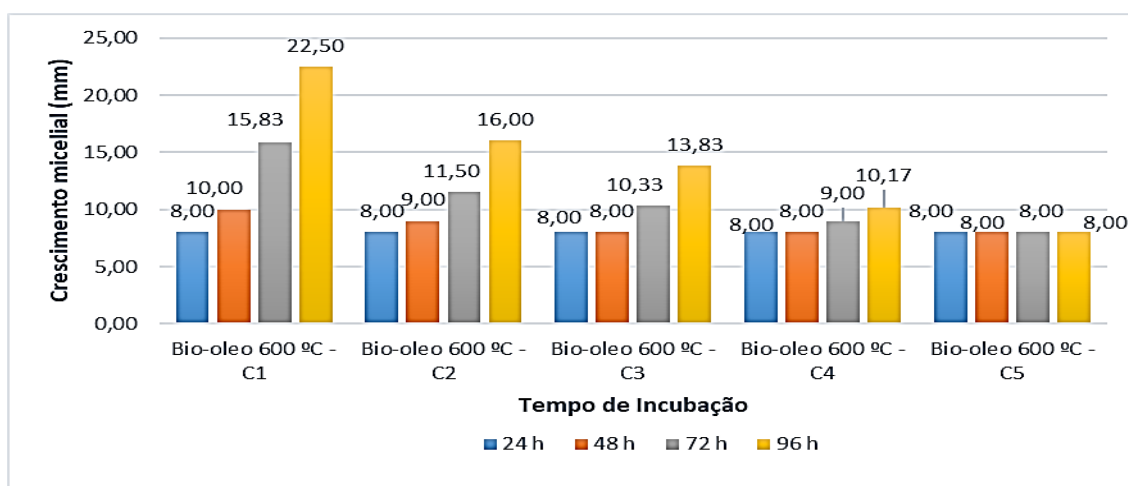
C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

**Figura 28.** Avaliação do crescimento do fungo *Fusarium solani* frente ao bio-óleo produzido a 500 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

**Figura 29.** Avaliação do crescimento do fungo *Fusarium solani* frente ao bio-óleo produzido a 600 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

#### 4.2.4. Avaliação da atividade antifúngica para as frações aquosas.

É importante mencionar que devido à natureza da amostra não foi necessário a utilização de DMSO, portanto, não há interferentes na determinação do potencial fungistático e fungicida.

#### 4.2.4.1. Avaliação da atividade antifúngica das frações aquosas frente ao fungo *Lasiodiplodia theobromae*.

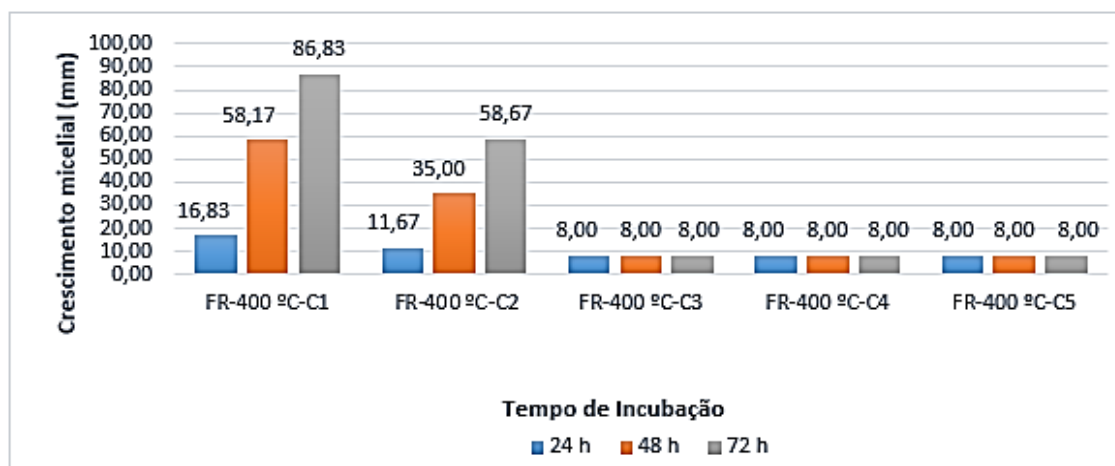
Em virtude da possibilidade de avaliação do controle de crescimento do *Lasiodiplodia theobromae* apenas até 72 h de incubação, as amostras das frações aquosas também tiveram seu crescimento avaliado nesse mesmo período. A Tabela 12 apresenta a porcentagem de inibição do crescimento do *Lasiodiplodia theobromae* frente as frações aquosas.

**Tabela 12.** Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente as frações aquosas.

Amostra	Tempo de análise	PIC (%)				
		C1	C2	C3	C4	C5
FR 400 °C	72 h	39,36	60,90	100	100,00	100,00
FR 500 °C		31,92	56,67	64,10	98,08	100,00
FR 600 °C		26,80	46,41	62,69	65,00	93,08

Neste estudo a fração aquosa apresentou potencial fungistático de 100% e potencial fungicida na concentração C4. Esse resultado para fração aquosa nos leva a concluir que é necessário identificar os componentes desta fração, a fim de conhecer os possíveis mecanismos de ação sobre o crescimento dos fungos. A Figura 30 apresenta os resultados do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente fração aquosa produzida a 400 °C.

**Figura 30.** Avaliação do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente a fração aquosa produzida a 400 °C.

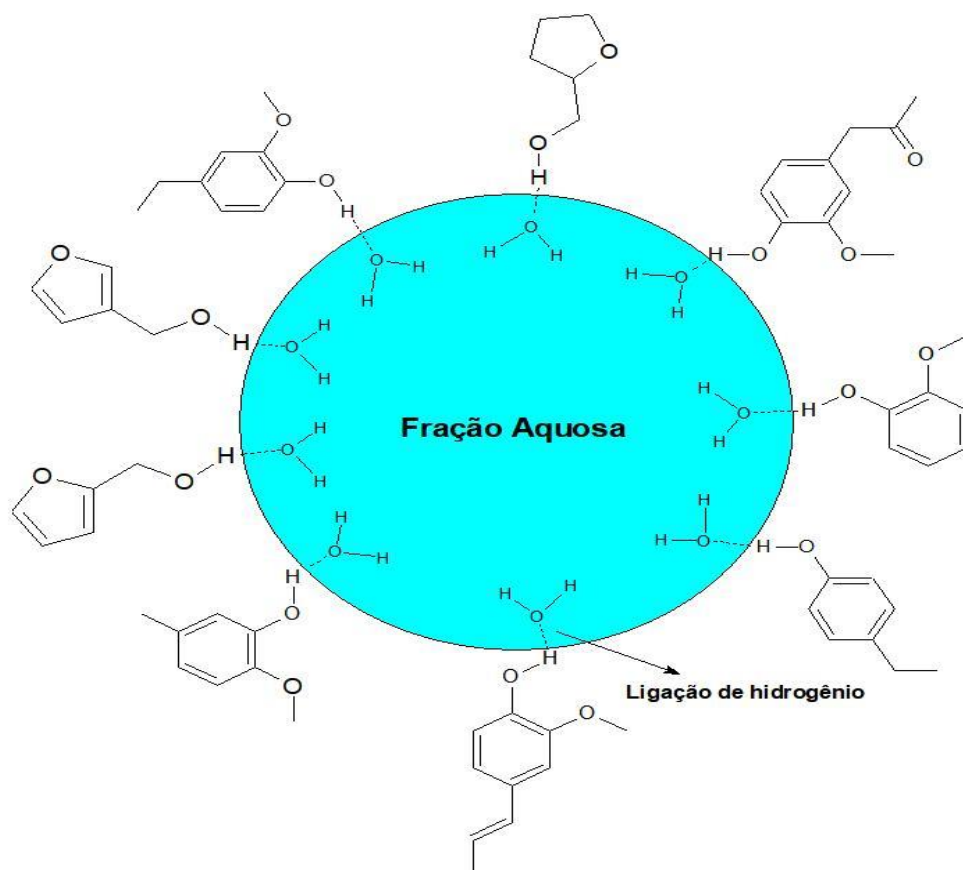


C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

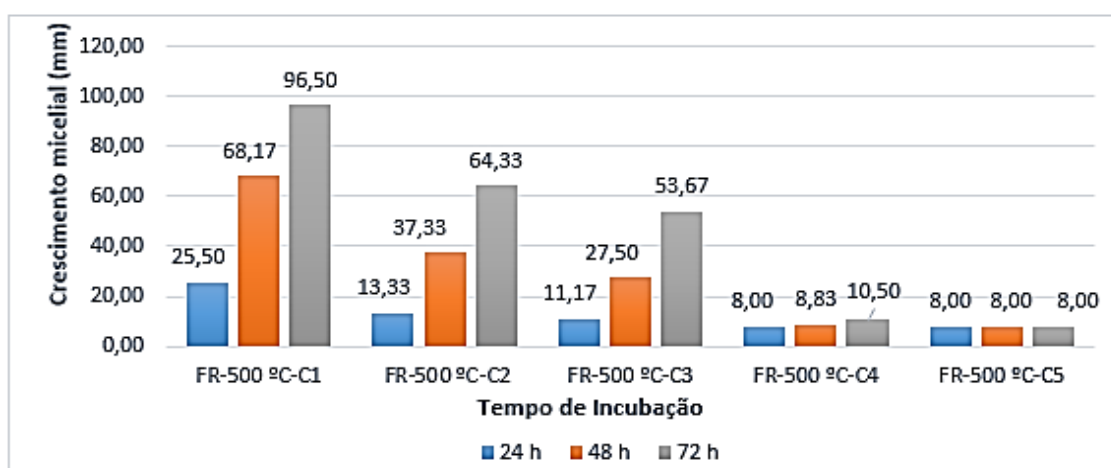
Em um estudo realizado por Schroeder *et al.* (2017) [83] sobre pirólise lenta da biomassa de sementes de graviola a temperatura de 400 °C, para a caracterização, a fração aquosa foi extraída com solventes orgânicos como o hexano, diclorometano e acetato de etila e analisada por GC/MS, obtendo nos três extratos 52 compostos identificados, revelando como principais as cetonas, álcoois e fenóis. Os autores acreditam que as ligações de hidrogênio sejam responsáveis pela miscibilidade destes compostos na fase aquosa. A Figura 31 apresenta algumas dessas interações.

A Figura 32 apresenta a avaliação do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente a fração aquosa produzida a 500 °C, na concentração C4 o crescimento foi evidenciado apenas após 72 h de incubação, apresentando um potencial fungistático de 97,90%. O máximo potencial foi obtido na concentração C5, e a amostra não apresentou potencial fungicida para o fungo em estudo.

**Figura 31.** Estruturas dos compostos encontrados no extrato hexânico **Fonte:** Schroeder *et al.* (2017) [83].



**Figura 32.** Avaliação do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente a fração aquosa produzida a 500 °C.

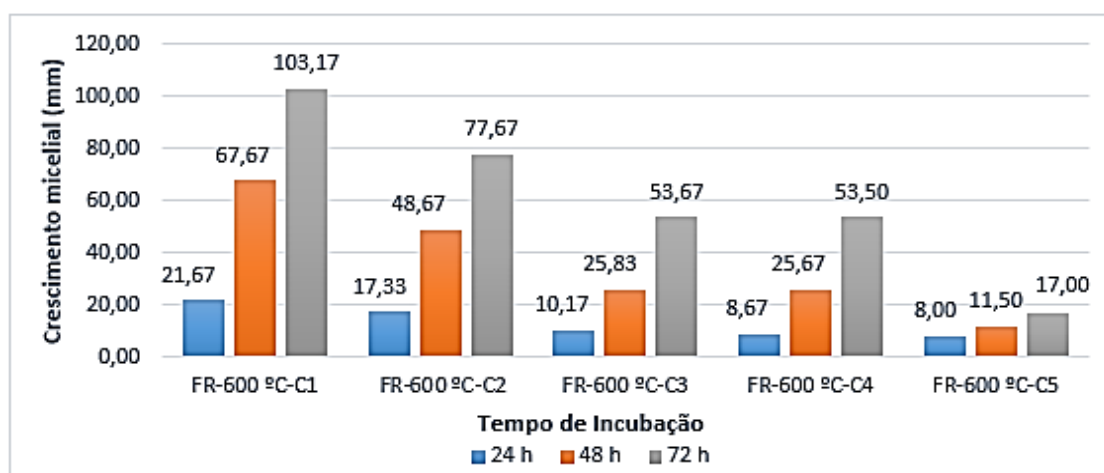


C1 = 10  $\mu L mL^{-1}$ , C2 = 20  $\mu L mL^{-1}$ , C3 = 30  $\mu L mL^{-1}$ , C4 = 40  $\mu L mL^{-1}$  e C5 = 50  $\mu L mL^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

Para a fração aquosa produzida a 600 °C, cujos os resultados do crescimento micelial são apresentados na Figura 33 e porcentagem de inibição do crescimento na Tabela 12, a concentração C4, apresentou menor potencial fungistático em comparação a fração aquosa a 400 °C, avaliando o crescimento, este inicia-se em 48 h de incubação e tem um aumento significativo em 72 h, em porcentagem de inibição do crescimento corresponde a 89,90%.

Estabelecendo uma ordem decrescente de potencial fungistático e/ou fungicida para as frações aquosas, está inicia com fração aquosa produzida a 400 °C, seguida pela fração a 500 °C e finalizando com a fração aquosa a 600 °C.

**Figura 33.** Avaliação do crescimento do fungo *Lasiodiplodia theobromae* frente a fração aquosa produzida a 600 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

#### 4.2.4.2. Avaliação da atividade antifúngica das frações aquosas frente ao fungo *Fusarium solani*

Os resultados apresentados das frações aquosas para o *Fusarium solani* corroboram com os dados obtidos para o *Lasiodiplodia theobromae* demonstrando que a fração produzida a 400 °C tem maior potencial fungistático, alcançando 100% de inibição na concentração C3. A Tabela 13

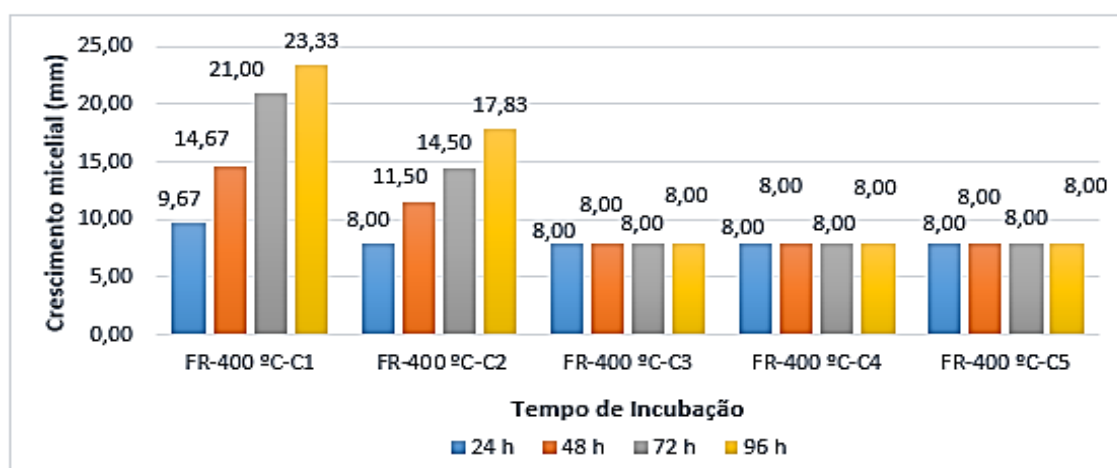
apresenta as respectivas porcentagens de inibição para as frações aquosas frente ao *Fusarium solani*.

**Tabela 13.** Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) do fungo *Fusarium solani* frente as frações aquosas.

Amostra	Tempo de análise	PIC (%)				
		C1	C2	C3	C4	C5
FR 400 °C	96 h	34,75	58,16	100	100	100
FR 500 °C		23,40	45,39	63,12	75,18	100
FR 600 °C		4,26	19,86	41,84	49,65	56,87

Comparando com os valores obtidos para o bio-óleo frente ao *Fusarium solani* temos uma relação inversa, enquanto o bio-óleo apresentou maior potencial fungistático na temperatura de 600 °C, para a fração aquosa o maior potencial foi verificado na temperatura de 400 °C, e apenas a fração aquosa produzida a 400 °C apresentou potencial fungicida na concentração C4. As Figuras 34, 35 e 36 apresentam o crescimento do *Fusarium solani* frente as frações aquosas.

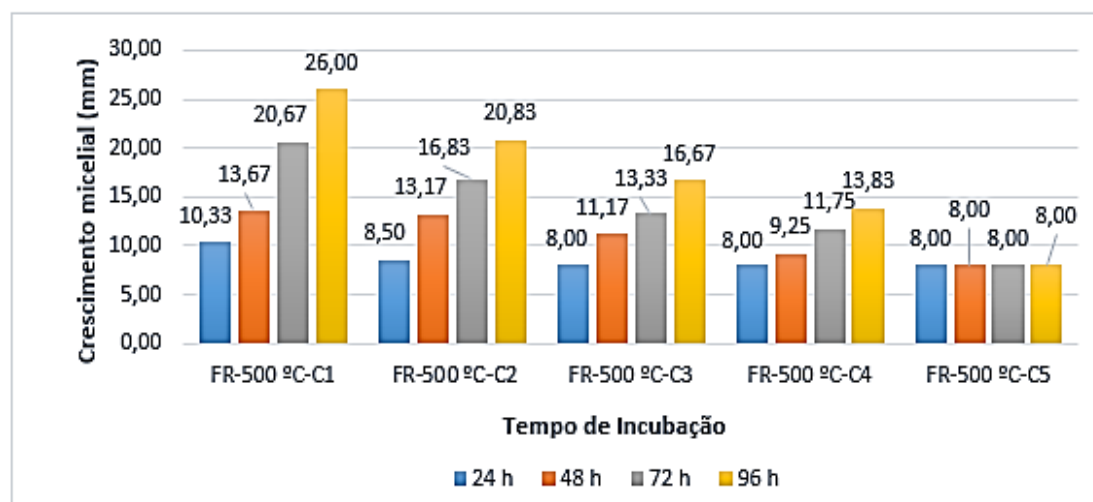
**Figura 34.** Avaliação do crescimento do fungo *Fusarium solani* frente a fração aquosa produzida a 400 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

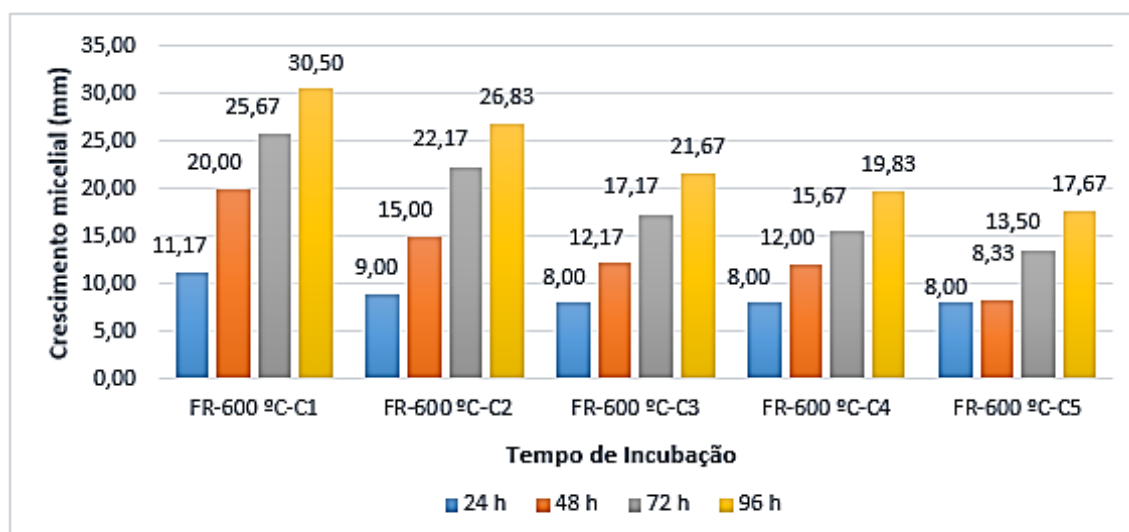


**Figura 35.** Avaliação do crescimento do fungo *Fusarium solani* frente a fração aquosa produzida a 500 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

**Figura 36.** Avaliação do crescimento do fungo *Fusarium solani* frente a fração aquosa produzida a 600 °C.



C1 = 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C2 = 20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C3 = 30  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , C4 = 40  $\mu\text{L mL}^{-1}$  e C5 = 50  $\mu\text{L mL}^{-1}$  da amostra por mL de meio de cultura, o Batata Dextrose Agar (BDA).

A investigação das frações aquosas produzidas em diferentes temperaturas através do processo de pirólise pode fornecer dados importantes, tanto a cerca da temperatura ideal para a obtenção dos compostos de interesse com ação antifúngica, como para sua utilização como possível fonte alternativa na produção de fungicidas.

Os resultados apresentados para as frações aquosas demonstram que a fração aquosa em todas as temperaturas tem potencial para inibição de crescimento dos fungos, entretanto, os valores apresentados para a fração aquosa produzida a 400 °C onde foi obtido um maior potencial fungistático, alcançando 100% de inibição na concentração C4.

Comparando com os valores obtidos para o bio-óleo temos uma relação inversa, enquanto o bio-óleo apresentou maior potencial fungistático na temperatura de 600 °C, para a fração aquosa o maior potencial foi verificado na temperatura de 400 °C, e apenas a fração aquosa a 400 °C apresentou potencial fungicida na concentração C4, para ambos os fungos em estudo.

#### 4.2.5. Avaliação da concentração para inibir 50% do crescimento micelial do fungo (IC<sub>50</sub>).

Apenas as análises da atividade antifúngica para bio-óleos com 1% de DMSO e frações aquosas foram analisados estatisticamente. O desvio padrão foi calculado apenas para as medidas realizadas em triplicata, ao final do tempo de incubação, sendo 72 h para o *Lasiodiplodia theobromae* e 96 h para o *Fusarium solani*.

A análise de regressão linear para determinar a concentração que inibiu 50% (IC<sub>50</sub>) do crescimento do micelial do fungo foi estimada através do programa GraphPad Prisma® e calculado a partir das equações geradas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

As Tabelas 14 e 15 apresentam as porcentagens de inibição do crescimento e desvio padrão dos bio-óleos e frações aquosas em função dos logs das concentrações e dos fungos em estudo.

A estimativa da concentração média do composto ativo eficaz para inibir 50% do crescimento micelial têm sido utilizada para avaliar a sensibilidade aos fungicidas, permitindo uma comparação para diferenciar os níveis de sensibilidade das amostras em diferentes fungos em estudo [84]. Os IC<sub>50</sub> foram calculados a partir da equação da reta e os gráficos com suas respectivas equações, coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e valores de IC<sub>50</sub>. Esses dados são apresentados nas Figuras 37 e 38.

**Tabela 14.** Porcentagem de inibição do crescimento e desvio padrão das amostras de bio-óleos frente aos fungos.

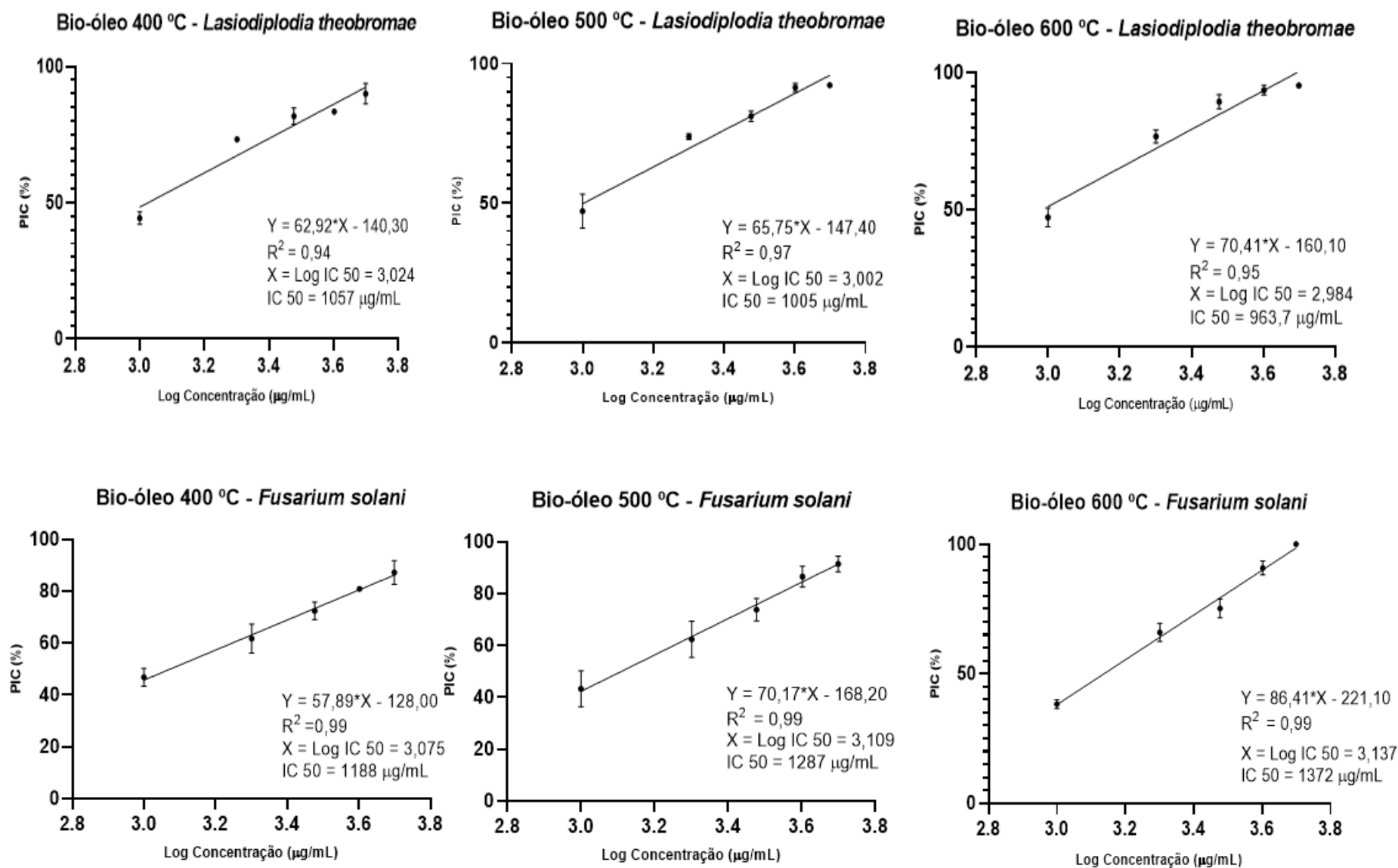
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>						
Log Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Bio-óleo 400 °C		Bio-óleo 500 °C		Bio-óleo 600 °C	
	PIC (%)	DP	PIC (%)	DP	PIC (%)	DP
3,00	44,36	2,23	47,18	6,12	47,18	3,473389
3,30	73,33	0,65	73,85	1,13	76,67	2,377851
3,48	81,79	3,02	81,15	1,88	89,36	2,614882
3,60	83,46	0,94	91,41	1,45	93,59	1,785691
3,70	90,00	3,77	92,31	0,83	95,26	0,362619
<i>Fusarium solani</i>						
Log Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Bio-óleo 400 °C		Bio-óleo 500 °C		Bio-óleo 600 °C	
	PIC (%)	DP	PIC (%)	DP	PIC (%)	DP
3,00	46,81	3,47	44,68	6,95	38,30	1,74
3,30	61,70	5,58	62,41	7,02	65,96	3,47
3,48	72,34	3,47	73,76	4,37	75,18	3,62
3,60	80,85	0,00	86,52	4,01	90,78	2,65
3,70	87,23	4,60	91,49	3,01	100,00	0,00

**Tabela 15.** Porcentagem de inibição do crescimento e desvio padrão das amostras de frações aquosas frente aos fungos.

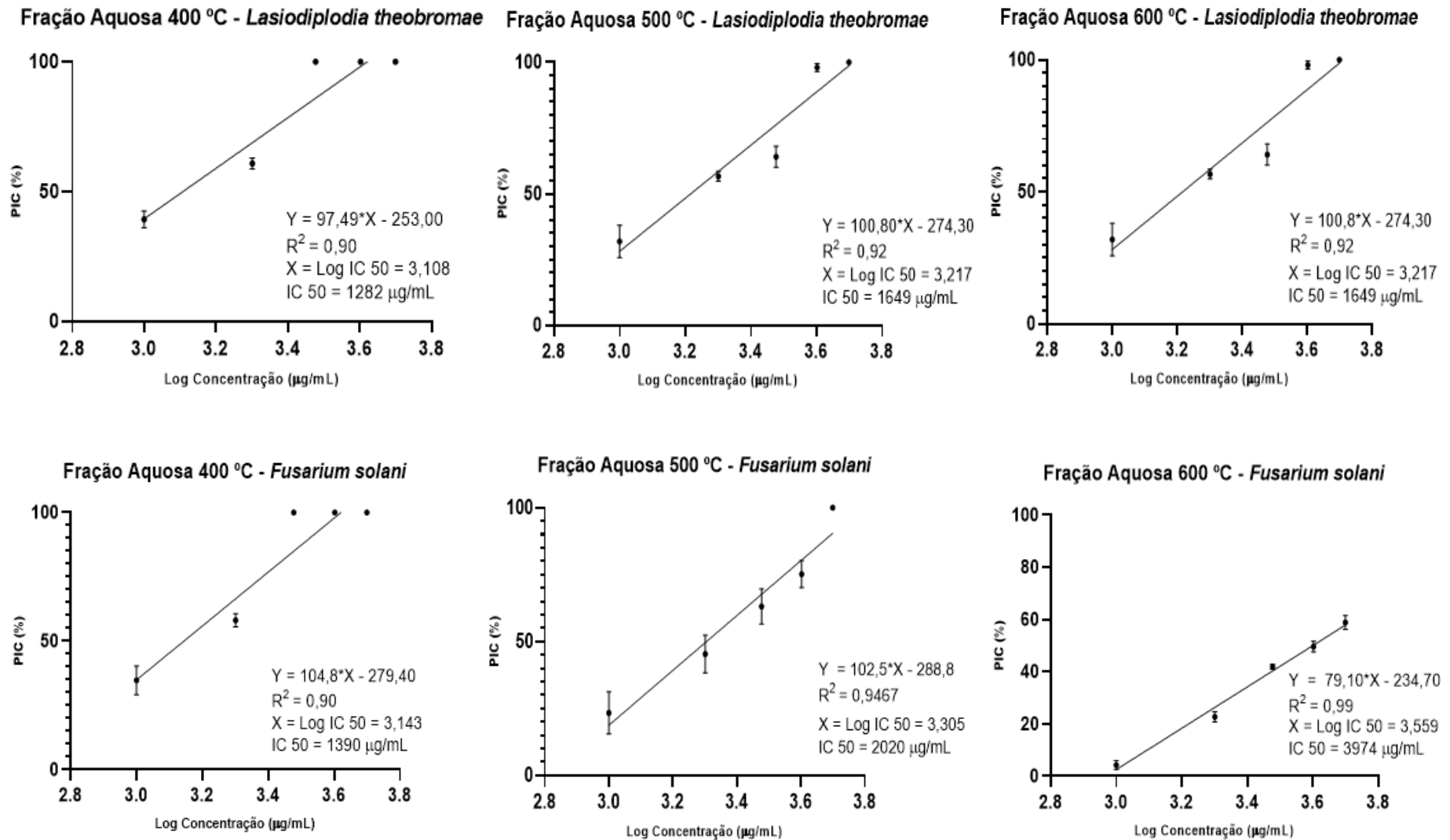
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>						
Log Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Fração Aquosa 400 °C		Fração Aquosa 500 °C		Fração Aquosa 600 °C	
	PIC (%)	DP	PIC (%)	DP	PIC (%)	DP
3,00	39,36	3,36	31,92	6,19	26,79	6,48
3,30	60,90	2,14	56,67	1,89	46,41	2,67
3,48	100,00	0,00	64,10	4,00	69,87	4,45
3,60	100,00	0,00	98,08	1,57	66,54	2,49
3,70	100,00	0,00	100,00	0,00	93,08	3,57
<i>Fusarium solani</i>						
Log Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Fração Aquosa 400 °C		Fração Aquosa 500 °C		Fração Aquosa 600 °C	
	PIC (%)	DP	PIC (%)	DP	PIC (%)	DP
3,00	34,75	5,58	23,40	7,96	4,26	1,74
3,30	58,16	2,65	45,39	7,02	22,70	5,31
3,48	100,00	0,00	63,12	6,58	41,84	1,00
3,60	100,00	0,00	75,18	5,01	49,65	2,01
3,70	100,00	0,00	100,00	0,00	58,87	2,65



**Figura 37.** Regressão linear e IC<sub>50</sub> para os bio-óleos frente aos fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium solani*.



**Figura 38.** Regressão linear e IC<sub>50</sub> para as frações aquosas frente aos fungos *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium solani*.



Os fungicidas podem ser classificados em duas classes, os protetores e os sistêmicos, sendo que a diferença entre eles é a concentração do composto ativo, os protetores possuem uma concentração efetiva maior que os sistêmicos. E um fungo pode ser sensível ou não a um determinado composto em função dos seus fatores genéticos. Se o fungo é sensível a um fungicida, ele possui fungitoxicidade, porém se não apresentar fungitoxicidade podemos considerar que ele é insensível [84].

Nesse sentido, é importante mencionar que nem todo produto químico é tóxico para os fungos, também não existem fungicidas comerciais que sirvam para o controle de todos os fungos. Segundo alguns estudos relacionados ao potencial fungicida de alguns compostos, pode ser utilizada a seguinte classificação:  $IC_{50} < 1 \mu g mL^{-1}$ : alta sensibilidade (AS);  $IC_{50} 1-10 \mu g mL^{-1}$  = moderada sensibilidade (MS);  $IC_{50} 10-50 \mu g mL^{-1}$  = baixa sensibilidade (BS);  $IC_{50} > 50 \mu g mL^{-1}$  = insensibilidade (I) [84].

**Tabela 16.** Sensibilidade das amostras de acordo com o  $IC_{50}$  frente aos fungos.

Amostra	Sensibilidade							
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>				<i>Fusarium solani</i>			
	$R^2$	$IC_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	$S^b$	$E^c$	$R^2$	$IC_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	$S^b$	$E^c$
Bio-óleo 400 °C	0,94	1058	I	I	0,99	1188	I	I
Bio-óleo 500 °C	0,97	1005	I	I	0,99	1287	I	I
Bio-óleo 600 °C	0,95	963,7	I	I	0,99	1372	I	I
Fração Aquosa 400 °C	0,90	1282	I	I	0,90	1390	I	I
Fração Aquosa 500 °C	0,92	1649	I	I	0,95	2020	I	I
Fração Aquosa 600 °C	0,92	1974	I	I	0,99	3974	I	I

$IC_{50}$  (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial); <sup>b</sup> Sensibilidade do fungo aos fungicidas (AS: alta sensibilidade; BS: baixa sensibilidade; MS: moderada sensibilidade e I: insensibilidade); <sup>c</sup> Eficiência do fungicida (AE: alta eficiência; ME: moderada eficiência; BE: baixa eficiência e I: insensibilidade).



Como evidenciado na Tabela 16, tanto os bio-óleos, quanto as frações aquosas em relação ao  $IC_{50}$  são considerados insensíveis, ou não tóxicos ao fungo, da mesma forma com relação à eficiência, os fungos apresentaram-se insensíveis. Em função da alta concentração da amostra, o bio-óleo e a fração aquosa podem ser considerados como fungicidas protetores.

Entretanto, levando em consideração a complexidade do bio-óleo e o não conhecimento da concentração real dos componentes da fração aquosa, estudos posteriores são necessários para elucidar a composição e sua relação com o potencial fungistático apresentado pelo bio-óleo e potencial fungistático e fungicida para a fração aquosa produzida a 400 °C.

Os bio-óleos apresentaram ( $p>0,05$ ), isso indica que não há uma diferença significativa em relação ao potencial de ação, indicando que a temperatura de pirólise não tem influência sobre a atividade antifúngica, sendo está exclusiva da concentração dos componentes. Já as frações aquosas apresentaram ( $p<0,05$ ) implicando em desempenhos diferentes tanto em termo de temperatura ideal, quanto concentração.

### 4.3 Caracterização da fração líquida da pirólise esterco bovino

#### 4.3.1 Análise Elementar

As porcentagens elementares de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e oxigênio (O) presentes nos bio-óleos produzidos a 400 °C, 500 °C e 600 °C estão apresentados na Tabela 17. Os resultados das análises mostraram que o carbono e o oxigênio são os principais constituintes dos bio-óleos.

**Tabela 17.** Composição elementar de bio-óleos obtidos através de pirólise de esterco bovino a diferentes temperaturas.

Análise	Bio-óleo 400 °C (%)	Bio-óleo 500 °C (%)	Bio-óleo 600 °C (%)
Carbono (C)	49,44	51,77	44,10
Hidrogênio (H)	9,09	9,25	9,12
Nitrogênio (N)	1,77	1,97	2,47
Oxigênio (O)*	39,7	37,01	44,31

\*Obtido por diferença

Comparando os dados obtidos com o de Santana (2017) [68] foi possível observar uma variação em termos de percentuais elementares, esta variação está relacionada a composição química da amostra e ao sistema de criação do gado já relatado no item 4.1. A Tabela 18 apresenta a composição elementar dos bio-óleos.

**Tabela 18.** Composição elementar dos bio-óleos obtidos da pirólise de esterco bovino em reator de cilindro rotativo. **Fonte:** Adaptada de Santana (2017) [68].

Análise	Bio-óleo 400 °C (%)	Bio-óleo 500 °C (%)	Bio-óleo 600 °C (%)
Carbono (C)	59,79	50,34	52,00
Hidrogênio (H)	7,91	6,70	6,67
Nitrogênio (N)	2,88	3,71	4,04
Oxigênio (O)*	29,43	39,26	37,28

\*Obtido por diferença

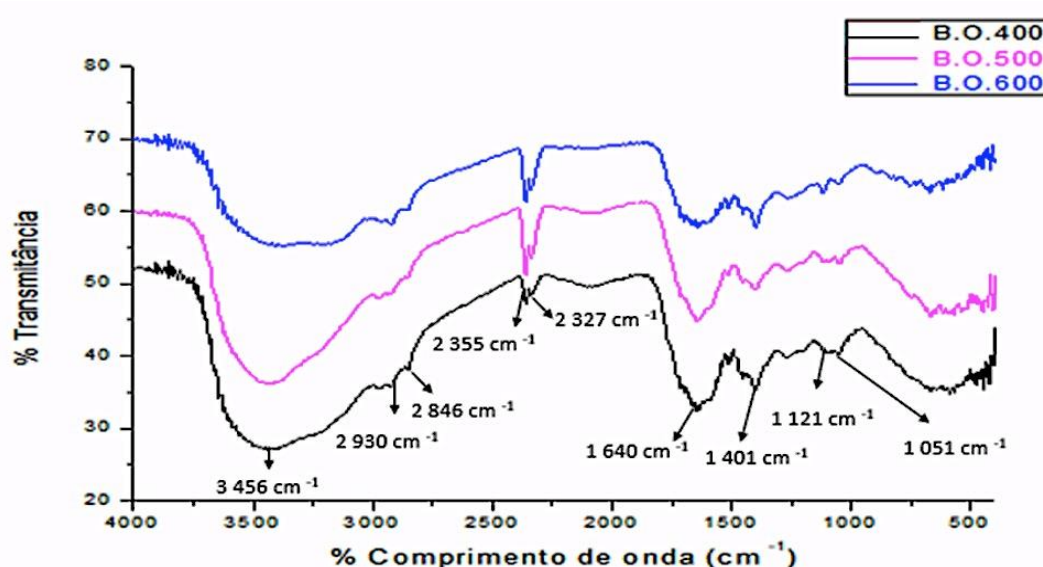
Os valores de porcentagem de oxigênio apresentam um perfil típico da matriz, a biomassa lignocelulósica. A alta oxigenação implica na formação minoritária de compostos da classe dos hidrocarbonetos, a amostra apresenta ainda uma composição majoritariamente oxigenada em função do craqueamento dos principais constituintes da biomassa lignocelulósica: a hemicelulose, a celulose e a lignina [64].

#### 4.3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

A presença dos grupos funcionais presentes nos bio-óleos foi avaliada através da espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier. Essa técnica de medição rápida é baseada na absorção do espectro por um grupo de funções específicas [65].

Analizando a Figura 39 que apresenta os espectros de infravermelho dos bio-óleos de esterco bovino obtidos a diferentes temperaturas de pirólise, foi possível observar que os perfis espectrais das amostras são similares em relação as principais bandas presentes e os mesmos grupos funcionais são formados mesmo com o aumento da temperatura de pirólise.

**Figura 39.** Espectro FTIR dos bio-óleo de esterco bovino.



A banda larga em  $3456\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibrações de estiramento de O-H [66], sendo associada à presença de álcoois, fenóis, ácidos, e água residual no bio-óleo, essa intensidade do estiramento possivelmente está associada a maior concentração de compostos oxigenados, e/ou maior teor de água. Vibração de estiramento nesta região também pode ser atribuída à ligação N-H ligação de aminas e amidas [68].

Estiramentos assimétricos e simétricos, em  $2930\text{ cm}^{-1}$  e  $2846\text{ cm}^{-1}$ , da ligação C-H de grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  de carbono  $\text{sp}^3$ , evidenciam a presença de grupos alifáticos e é verificada em todos os espectros, identificado também nas deformações C-H na região entre  $1460$  e  $1380\text{ cm}^{-1}$ . Vibrações de estiramento C-O, também podem ser observados na região de  $1051\text{ cm}^{-1}$ , que associados a bandas de OH, indicam a presença de álcoois e fenóis. Absorção em regiões de menores frequências, próximas a  $1110\text{ cm}^{-1}$ , evidencia a presença de álcoois [68].

A banda observada em comprimento de onda próximo a  $2360\text{ cm}^{-1}$  é relacionada ao  $\text{CO}_2$  presente no ambiente. Bandas largas na região de  $1700$ - $1640\text{ cm}^{-1}$  apareceram no espectro de todos os bio-óleos, a absorção nessa região pode ser atribuída ao estiramento de ligação de grupos C=O de ácidos carboxílicos [64].

#### 4.3.3 *Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS) para os Bio-óleos.*

Os bio-óleos obtidos através da pirólise foram caracterizados por GC/MS, utilizando as mesmas condições de análise. Os valores percentuais são relativos, uma vez que, indicam as proporções dos compostos individuais e não a concentração real destes compostos na amostra. Desta forma temos uma avaliação comparativa e semi-quantitativa dos compostos detectados.

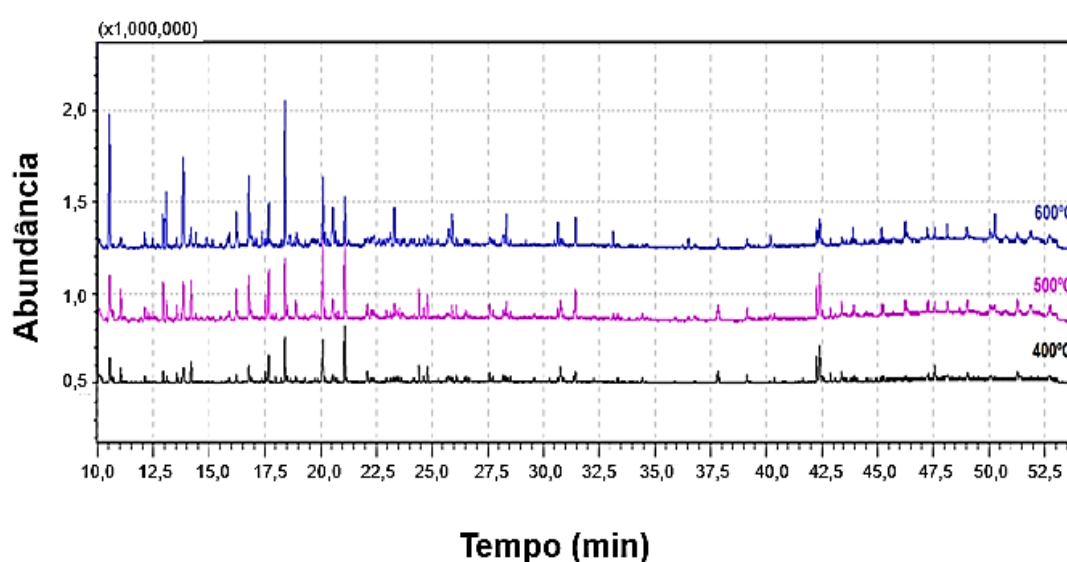
A identificação dos compostos foi realizada com base na espectroteca Wiley 8 (WR10 e WR10R), considerando índice de similaridade acima de 80%. Os compostos não identificados que apresentarem similaridade abaixo da determinada anteriormente aparecem no texto com a sigla (N.I.).

Devido à complexidade da amostra e a limitação da técnica utilizada, possivelmente há co-eluições e conseqüentemente uma baixa relação de

similaridade entre os espectros de massas, não sendo possível a sua identificação. Os compostos que apresentaram similaridade acima de 80% foram classificados em classes químicas.

A Figura 40 apresenta os cromatogramas das correntes totais de íons (TICC) resultantes das análises por GC/MS para as soluções dos bio-óleos. É possível observar que os perfis cromatográficos apresentaram similaridades para os bio-óleos em estudo.

**Figura 40.** TICCs dos bio-óleos de esterco bovino.

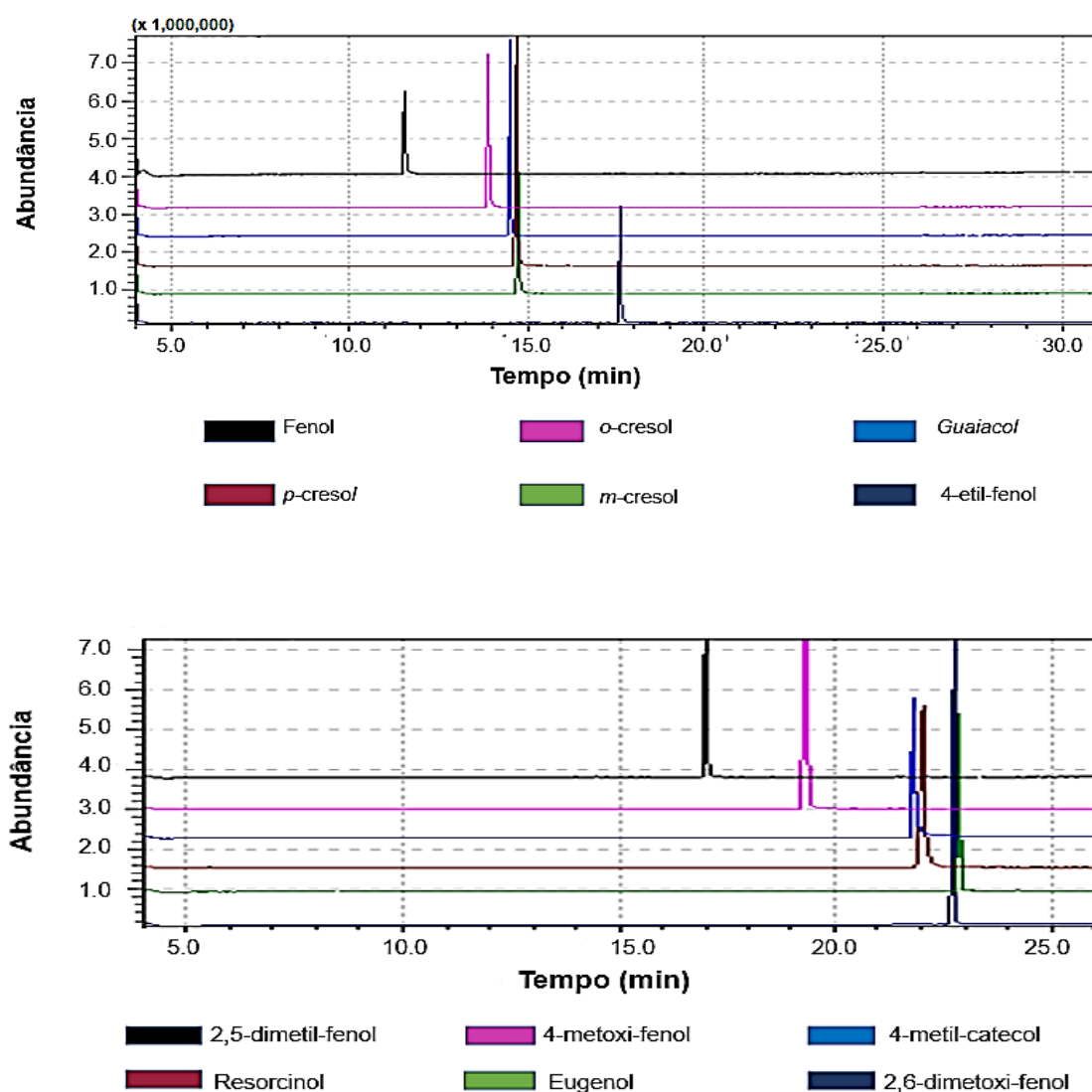


A integração dos picos para área relativa apresentou a detecção de 104, 111 e 109 compostos para os bio-óleos as temperaturas de 400 °C, 500 °C e 600 °C, respectivamente, considerando apenas área relativa a partir de 0,10%. Os compostos identificados são apresentados excluindo interferentes com: os picos derivados do solvente e do agente derivatizante. Esses dados são apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19.** Picos cromatográficos identificados para os bio-óleos.

	Bio-óleo		
	400 °C	500 °C	600 °C
<b>Compostos detectados</b>	104	111	109
<b>Compostos identificados</b>	59	71	63
<b>Área dos compostos identificados</b>	77,92%	71,16%	78,69%

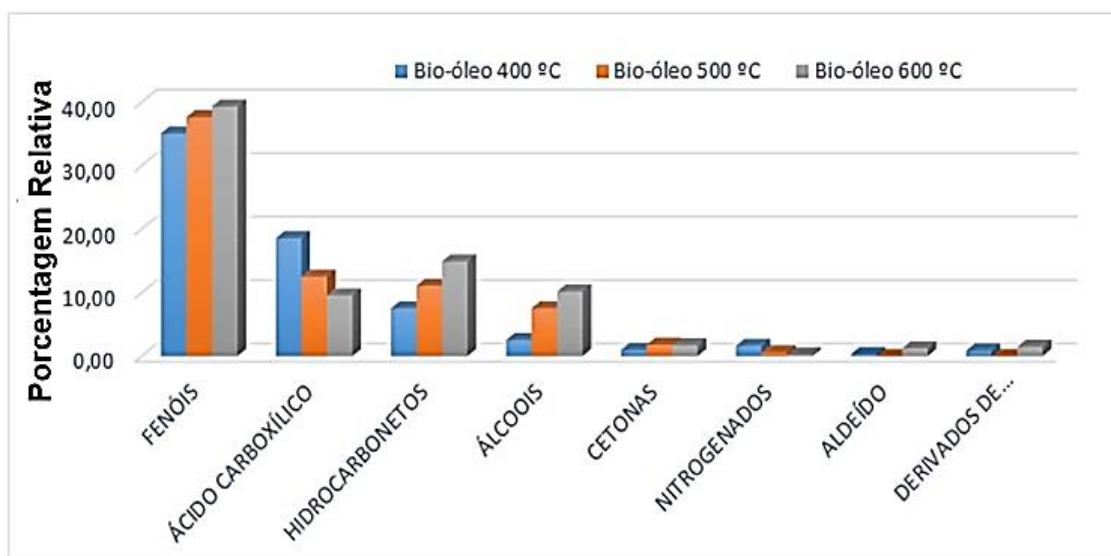
Para a identificação uma série de 12 padrões fenólicos obtidos do Laboratório de Análises Cromatográficas (LAC-UFS) foram injetados nas mesmas condições cromatográficas para as amostras. A Figura 41 apresenta TICCs dos padrões fenólicos.

**Figura 41.** TICCs dos padrões fenólicos.

Diante dos resultados apresentados, com os cromatogramas apresentando um percentual mínimo de 71,16% de área relativamente identificada é possível considerar que esse é um bom percentual de elucidação, se levarmos em consideração a complexidade da amostra e as limitações da técnica utilizada.

A identificação dos compostos foi realizada e as seguintes classes química foram encontradas: fenóis, álcoois, hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos e em menor quantidade cetonas, derivado de açúcares, aldeídos e compostos nitrogenados. Esses dados são apresentados na Figura 42.

**Figura 42.** Classes dos compostos identificados para os bio-óleos de esterco bovino em porcentagem.



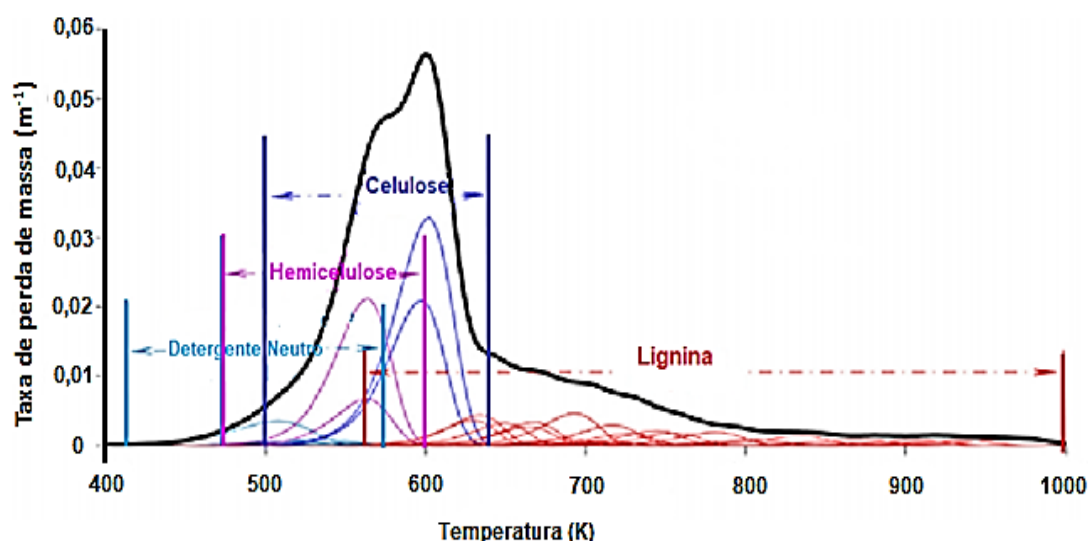
A classe dos compostos fenólicos foi predominante nas amostras de bio-óleos, seguida pela classe dos ácidos carboxílicos, hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, nitrogenados, aldeídos e derivados de açúcares. O aumento da temperatura resultou no aumento dos compostos fenólicos, hidrocarbonetos e álcoois, à medida que ocorreu uma diminuição dos ácidos carboxílicos e compostos nitrogenados.

Um maior percentual de compostos fenólicos é esperado para o bio-óleo produzido a 600 °C com base na cinética da pirólise de esterco bovino, uma vez que, os constituintes se decompõem em diferentes etapas, que ocorre em

função da diferença de suas estruturas físico-químicas. Quanto mais complexa a estrutura, mais difícil a decomposição, e consequentemente maior a temperatura necessária.

Os constituintes do esterco bovino podem ser divididos em detergente neutro solúvel (por exemplo, proteínas, amidos, lípidos, açúcares, etc.), hemicelulose, celulose e lignina. A lignina tem uma estrutura mais complexa do que os outros constituintes e uma faixa de atividade extremamente ampla para as ligações químicas e grupos funcionais [67]. A Figura 43 apresenta as faixas de temperaturas para a decomposição dos constituintes do esterco bovino.

**Figura 43.** Processo de pirólise de esterco bovino sob taxa de aquecimento de  $10\text{ K min}^{-1}$ , relação entre os constituintes e suas temperaturas de degradação.  
**Fonte:** Cao; H. *et al.* (2014) [87].



A degradação do detergente neutro ocorre em torno de 512 K, com decomposição inicial na temperatura de 410 K e final em cerca de 580 K. Após cerca de 60 K do início de decomposição do detergente neutro solúvel, a hemicelulose começa a se decompor, atingindo o valor máximo em torno de 563 K. Na temperatura de 600 K, a celulose está se decompondo com a taxa máxima de perda de massa. As temperaturas inicial e final de decomposição da celulose são 500 e 640 K, respectivamente. A lignina tem uma ampla região de decomposição de 560 a 1000 K devido a sua estrutura físico-química complexa [87].



Espera-se que os componentes fenólicos sejam os principais responsáveis pela atividade antifúngica do bio-óleo de esterco bovino. Porém, a presença de outros compostos em menores quantidades, tanto pode potencializar o efeito antifúngico do bio-óleo, quanto reduzir seu potencial, favorecendo a sobrevivência do fungo [88].

Os hidrocarbonetos apresentaram respectivamente, valores de 7,85%, 10,09% e 14,41%, para os bio-óleos produzidos a 400 °C, 500 °C e 600 °C, e podem favorecer a sobrevivência dos fungos porque constituem-se como uma das principais fontes de nutrientes. A formação destes compostos pode ser em virtude das reações de descarboxilação dos ácidos graxos com o aumento da temperatura [50,69]. Em quantidades menores também temos os derivados de açúcares, provenientes da decomposição da celulose e hemicelulose.

O fenol foi o componente majoritário da área percentual relativa das soluções de bio-óleo apresentando 4,76%, 5,84% e 9,30% das soluções de bio-óleos obtidos a 400 °C, 500 °C e 600 °C, respectivamente. Relacionando ainda com os resultados obtidos para a atividade antifúngica, a maior eficiência em potencial fungistático do bio-óleo pode estar associado a maior percentagem de compostos fenólicos no bio-óleo produzido a 600 °C.

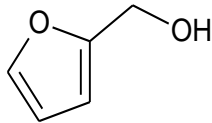
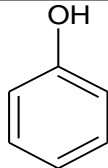
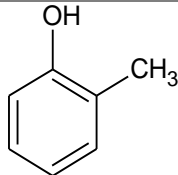
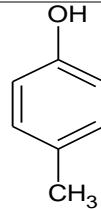
O mecanismo de ação ocorre pela lesão das células microbianas alterando a permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, causando uma perda das substâncias intracelulares vitais. Esses compostos também desnaturam proteínas como as enzimas [70].

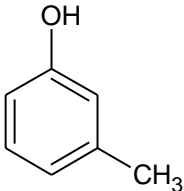
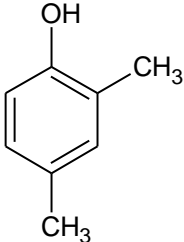
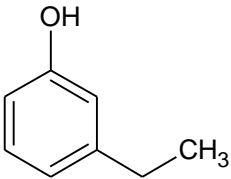
A capacidade dos produtos fenólicos no óleo de pirólise para atividade antioxidante é esperada também com base no comportamento conhecido de antioxidantes fenólicos substituídos, como por exemplo, na degradação fúngica da madeira que ocorre por ataque oxidativo e quebra de lignina por radicais hidroxilo, o bio-óleo pode atuar como um dissipador estequiométrico por reagir com radicais hidroxilo, impedindo assim o ataque à estrutura lignocelulósica da madeira [91].

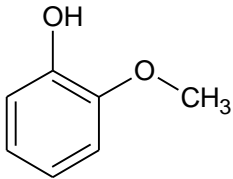
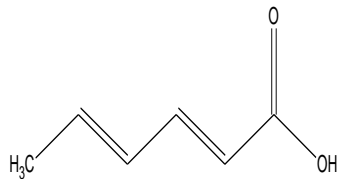
Foram identificados 32 compostos majoritários para os bio-óleos nas três temperaturas de estudo, considerando como majoritários os compostos que apresentaram área cromatográfica percentual relativa maior do que 1% ao menos para uma das temperaturas de análise, levando em consideração

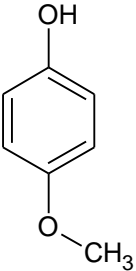
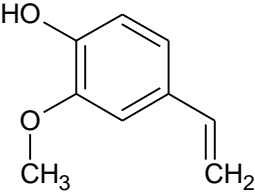
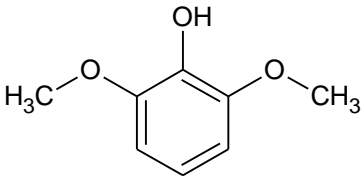
também os compostos detectados e não identificados. A Tabela 20 apresentar os compostos majoritários presentes nos bio-óleos.

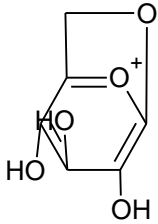
**Tabela 20.** Compostos majoritários encontrados nas soluções de bio-óleos de esterco bovino.

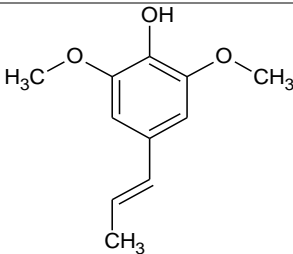


	Composto	400 °C		500 °C		600 °C		Estrutura
		tR (min)	Área Relativa (%)	tR (min)	Área Relativa (%)	tR (min)	Área Relativa (%)	
1	N.I.	10,096	2,80	10,092	1,98	10,087		
2	2-furaro-metanol	11,030	1,29	11,031	--	11,030	--	
3	fenol	12,943	4,76	12,943	5,84	12,941	9,30	
4	<i>o</i> -cresol	--	--	13,093	1,35	13,086	2,93	
5	<i>p</i> -cresol	13,837	2,17	13,833	3,22	13,827	6,53	

6	<i>m</i> -cresol	14,178	2,56	14,176	2,43	14,174	1,01	
7	N.I.	--	--	--	--	15,912	1,09	
8	2,4-dimetil-fenol (Xilenol)	16,217	1,12	16,219	2,19	16,213	2,19	
9	3-etil-fenol	16,773	2,24	16,773	2,74	16,776	4,04	
10	N.I.	--	--	--	--	17,361	1,05	

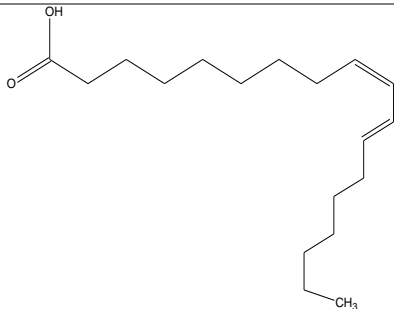
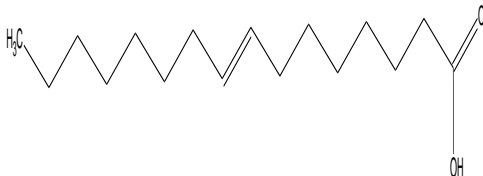
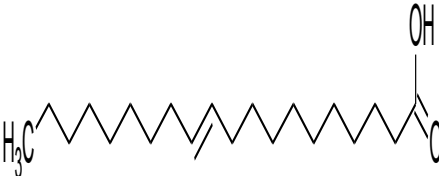
11	N.I.	17,506	1,24	17,508	1,30	17,512	0,41	
12	guaiacol	17,692	3,05	17,694	2,93	17,695	2,00	
13	Ácido 2,4-hexadienóico (Ácido sórbico)	18,403	5,55	18,404	4,07	18,410	7,85	
14	N.I.	--	--	18,895	1,30	--	--	


15	4-metóxi-fenol	20,083	6,11	20,086	N.I.	20,091	3,94	
16	N.I.	20,575	1,42	20,563	2,01	20,572	3,04	
17	2-metóxi-4-vinilfenol	21,091	6,45	21,093	4,98	21,098	2,88	
18	2,6-dimetóxi-fenol	22,092	1,77	--	--	22.100	0,53	
19	N.I.	24,412	1,87	24,414	1,62	--	--	

20	N.I.	24,788	1,76	24,790	1,53	--	--	
21	Levoglucozano	25,772	1,25	--	--	25,778	1,28	
22	N.I.	--	--	--	--	25,922	1,33	
23	N.I.	27,574	1,04	27,576	--	--	--	
24	N.I.	--	--	--	--	28,365	1,42	

25	2,6-dimetóxi-4-propenil-fenol	30.785	1,77	30.787	0,98	--	--	
26	1-dodecanol	31,445	1,24	31,451	1,73	31,457	1,43	
27	Ác. Hexadecanóico (Ácido Palmítico)	37,882	2,50	37,830	1,66	--	--	
28	N.I.	39,153	1,21	39,164	0,91	--	--	

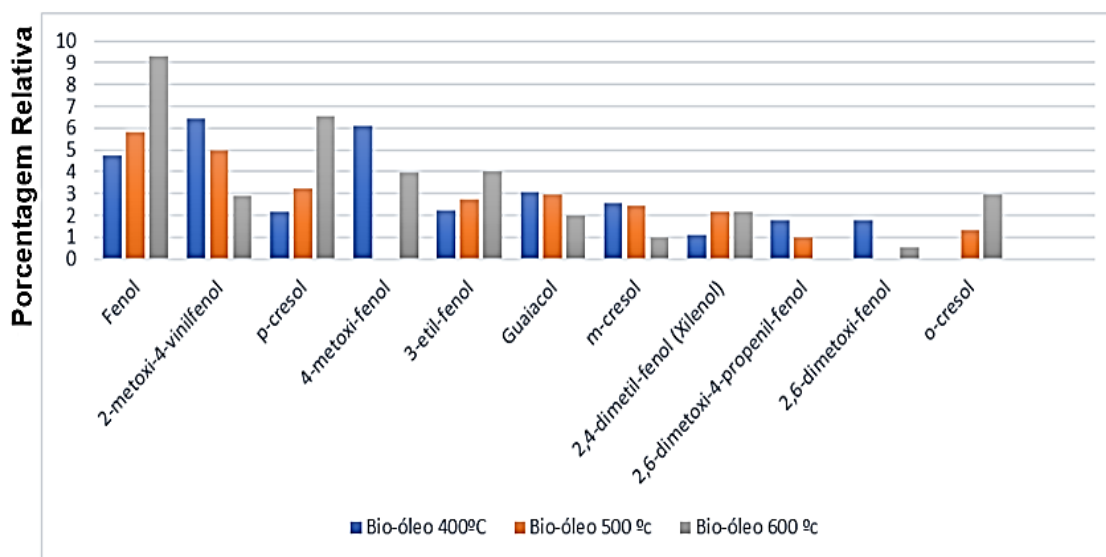


29	Ácido Linoleíco	42,270	2,66	42,272	1,81	--	--	
30	Ácido Oleíco	42,401	4,15	42,406	2,83	42,408	1,25	
31	Ácido Gondóico	47,281	1,12	--	--	--	--	
32	N.I.	--	--	--	--	50.271	1,45	

<b>33</b>	Nonacosano	51,309	1,02	51,311	1,01	--	--	
% Área total			<b>64,12</b>		<b>50,42</b>		<b>47,65</b>	
% Área dos compostos identificados			<b>52,78</b>		<b>39,77</b>		<b>37,86</b>	
% Área dos compostos não identificados			<b>11,34</b>		<b>10,65</b>		<b>9,79</b>	

Dos compostos majoritariamente identificados, 11 são derivados fenólicos, o fenol apresentou maior percentual, estabelecendo uma ordem de maior percentagem e presença em todas as temperaturas de pirólise temos: 2-metoxi-4-vinilfenol, *p*-cresol, 3-etil-fenol, guaiacol, *m*-cresol e 2,4-dimetil-fenol. A Figura 44 apresenta os compostos fenólicos majoritários presentes nos bio-óleos.

**Figura 44.** Compostos fenólicos majoritários presentes nos bio-óleos.



Um estudo realizado por Zabka, M. e Pavela, R. (2013) [92] a fim de avaliar propriedades antifúngicas contra fungos filamentosos, toxigenos e patogênicos como: *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides*, *Penicillium brevicompactum*, *P. expansum*, *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus*, 21 compostos fenólicos que apresentaram diferenças em sua estrutura química foram testados. Um maior potencial de inibição descrito pelos autores como 100% na concentração experimental  $1000 \text{ lg mL}^{-1}$  foi observado para os derivados fenólicos como: timol, carvacrol, isoeugenol, eugenol, 2-etilfenol, 4-etilfenol, salicilaldeído, 2-metóxi-4-metilfenol, 4-etilguaiacol e ácido acetilsalicílico). Já o guaiacol, vanilina e ácido *p*-cumárico causaram 100% inibição do crescimento em apenas alguns casos [92].

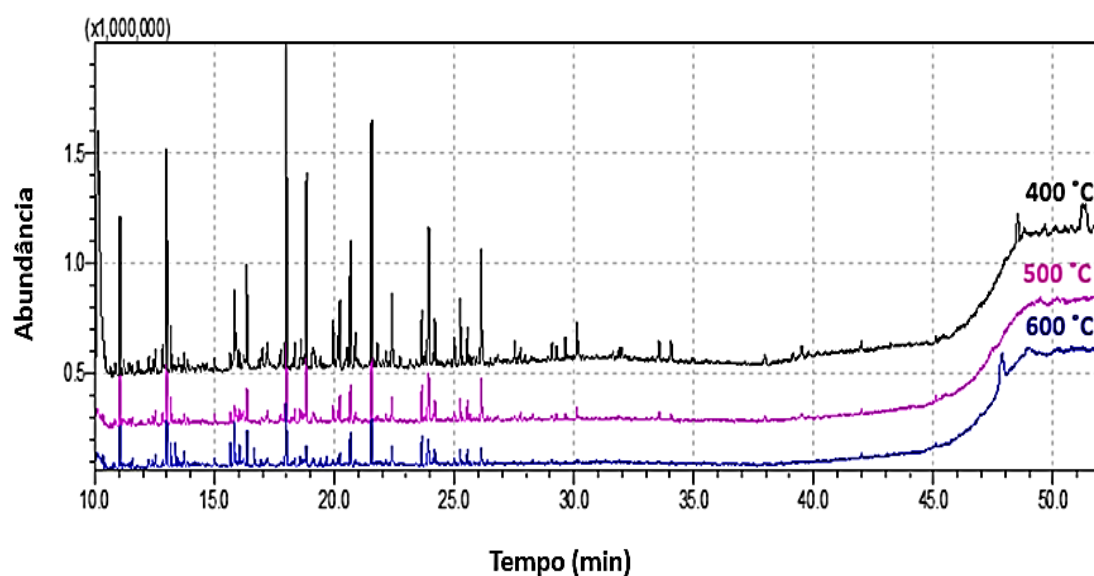
#### 4.3.4 Análise por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS) para as frações aquosas.

##### 4.3.4.1. Extração com Diclorometano

A avaliação para as frações aquosas é comparativa e semi-quantitativa dos compostos detectados. A identificação dos compostos foi realizada com base na espectroteca Wiley 8 (WR10 e WR10R), considerando índice de similaridade acima de 80%.

A Figura 45 apresenta os cromatogramas das correntes totais de íons (TICC) resultantes das análises por GC/MS para as soluções das frações aquosas extraídas com DCM.

**Figura 45.** TICCs das frações aquosas extraídas com DCM.



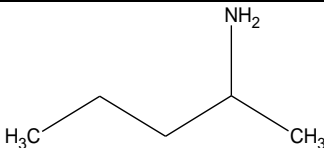
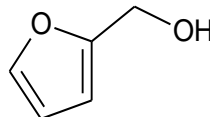
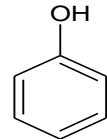
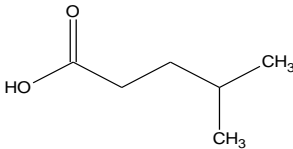
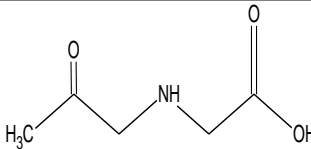
É possível observar que os perfis cromatográficos apresentaram similaridades para as frações aquosas em estudo, sendo que a fração produzida a 400 °C apresenta picos relativamente mais intensos que a fração produzida a 500 e 600 °C no intervalo de 25 a 30 minutos de corrida. A Tabela 21 apresenta os compostos detectados considerando uma área relativa mínima de 1%.

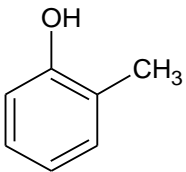
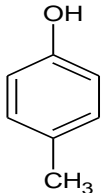
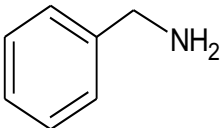
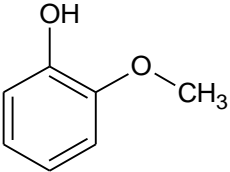
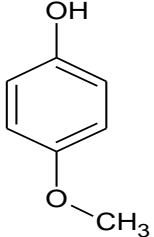
**Tabela 21.** Picos cromatográficos identificados para as frações aquosas extraídas com DCM.

	Fração Aquosa		
	400 °C	500 °C	600 °C
<b>Compostos detectados</b>	20	24	27
<b>Área dos compostos detectados</b>	68,73%	82,00%	86,00%
<b>Compostos identificados</b>	9	9	9
<b>Área dos compostos identificados</b>	48,67%	50,37%	51,19%

A integração dos picos para área relativa apresentou a detecção de 20, 24 e 27 compostos para as frações aquosas a temperaturas de 400 °C, 500 °C e 600 °C, respectivamente. A Tabela 22 apresenta os compostos majoritários encontrados para as frações aquosas extraídas com DCM.

**Tabela 22.** Compostos majoritários encontrados para as frações aquosas extraídas com DCM.

	Composto	400 °C		500 °C		600 °C		Estrutura
		tR (min)	Área Relativa (%)	tR (min)	Área Relativa (%)	tR (min)	Área Relativa (%)	
1	2-butanamina	10.131	16,07	--	--	--	--	
2	2-furano-metanol	11.052	3,39	11.047	5,13	11.049	5,58	
3	Fenol	12.992	4,69	12.995	9,15	12.997	18,40	
4	Ácido 4-metil pentanóico	--	--	--	--	13.730	1,30	
5	N-acetilglicina	15.828	1,68	15.829	1,27	15.830	3,24	

6	<i>o</i> -cresol	--	--	16.041	1,20	16.041	1,56	
7	<i>p</i> -cresol	16.343	2,47	16.356	2,83	16.364	2,97	
8	Benzilamina	17.987	8,64	17.980	14,93	17.981	9,10	
9	2-metóxi-fenol	18.828	4,17	18.827	5,50	18.825	1,79	
10	4-metóxi-fenol	20.224	1,65	20.224	2,11	--	--	

---

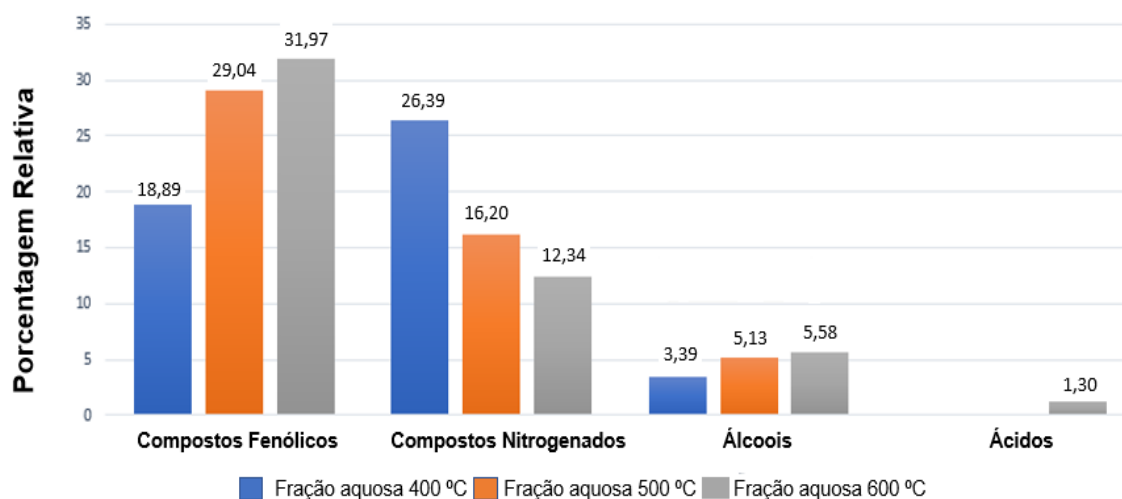
11	4-etil-catecol	21.545	5,91	21.545	8,25	21.544	7,25	
----	----------------	--------	------	--------	------	--------	------	---

---



Os compostos majoritários presentes nas frações aquosas são os fenólicos e os nitrogenados. Analisando a Figura 46 foi possível observar que a medida em que ocorre o aumento da temperatura de pirólise há um aumento da porcentagem dos compostos fenólicos e uma redução dos compostos nitrogenados.

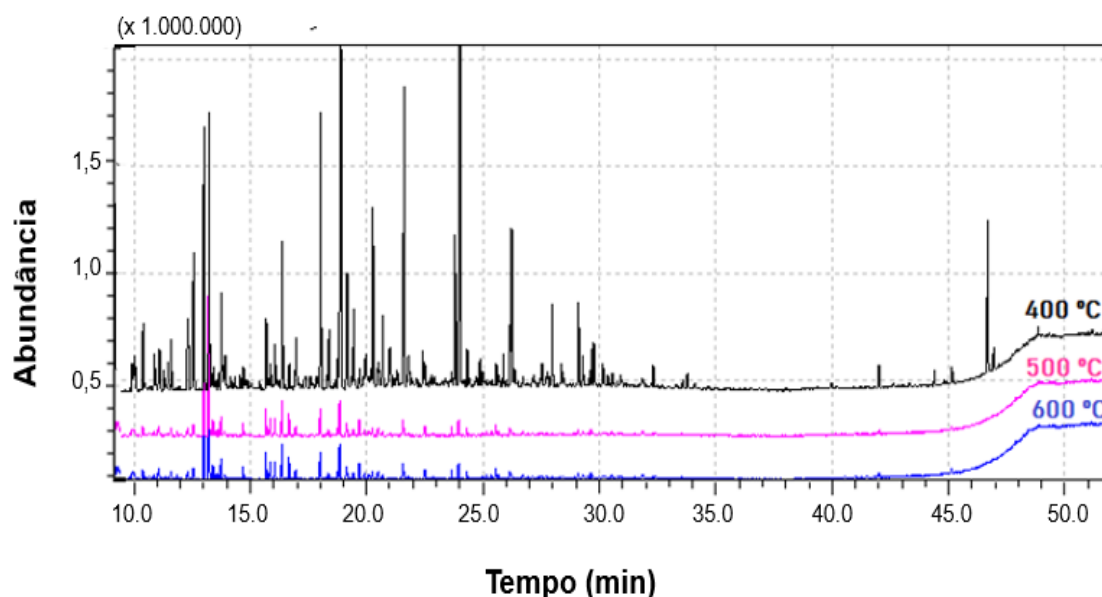
**Figura 46.** Compostos majoritários presentes nas frações aquosas extraídas com DCM.



#### 4.3.4.2. Extração com *n*-Hexano.

A Figura 47 apresenta os cromatogramas das correntes totais de íons (TICC) resultantes das análises por GC/MS para as soluções das frações aquosas extraídas com *n*-hexano.

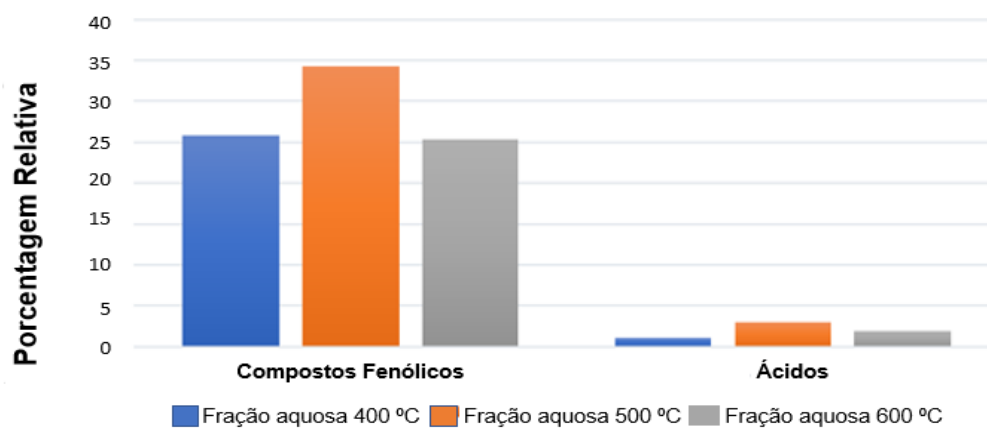
Os perfis cromatográficos apresentaram similaridades, entretanto, a fração produzida a 400 °C apresenta picos relativamente mais intensos que a fração produzida a 500 e 600 °C. A Tabela 23 apresenta os compostos detectados considerando uma área relativa mínima de 1%.

**Figura 47.** TICCs das frações aquosas extraídas com *n*-hexano.**Tabela 23.** Picos cromatográficos identificados para as frações aquosas extraídas com *n*-hexano.

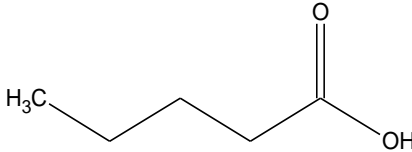
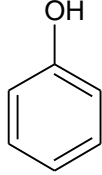
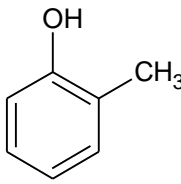
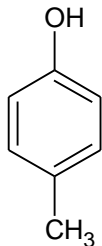
	Fração Aquosa		
	400 °C	500 °C	600 °C
<b>Compostos detectados</b>	22	28	26
<b>Área dos compostos detectados</b>	69,73%	58,00%	57,99%
<b>Compostos identificados</b>	7	7	7
<b>Área dos compostos identificados</b>	29,38%	37,24%	27,21%

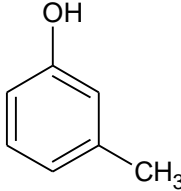
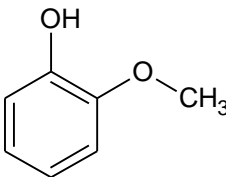
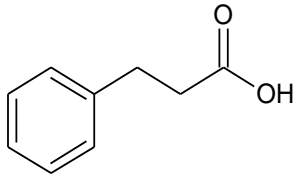
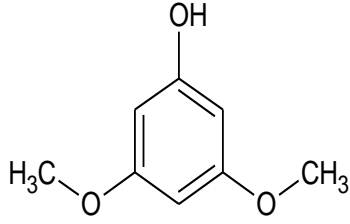
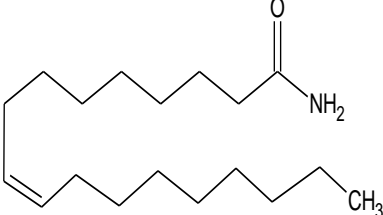
A integração dos picos para área relativa apresentou a detecção de 22, 28 e 26 compostos para as frações aquosas a temperaturas de 400 °C, 500 °C e 600 °C, respectivamente. Sendo os compostos majoritários presentes nas frações aquosas os fenólicos. A Figura 48 apresenta compostos majoritários presentes nas frações aquosas extraídas com hexano e a Tabela 24 os compostos majoritários presentes nas frações aquosas extraídas com diclorometano.

**Figura 48.** Compostos majoritários presentes nas frações aquosas extraídas com *n*-hexano.



**Tabela 24.** Compostos majoritários para as frações aquosas extraídas com *n*-hexano.

		400 °C		500 °C		600 °C		Estrutura
Composto		tR (min)	Área Relativa (%)	tR (min)	Área Relativa (%)	tR (min)	Área Relativa (%)	
1	Ácido pentanóico	10.393	1,1	10.375	1,44	10.378	1,04	
2	fenol	13.029	4,38	13.006	15,31	13.008	12,23	
3	<i>o</i> -cresol	15.694	1,27	15.676	4,56	15.672	3,71	
4	<i>p</i> -cresol	--	--	16.051	2,65	16.048	2,01	

5	<i>m</i> -cresol	16.394	2,42	16.373	5,89	16.379	3,43	
6	guaiacol	18.889	16,35	18.841	5,90	18.841	3,90	
7	Ácido benzeno propanoico	--	--	24.313	1,49	24.313	0,89	
8	3,5-dimetóxi-fenol	27.971	1,37	--	--	--	--	
9	9-octadecenamida	46.684	2,49	--	--	--	--	

---

#### 4.3.5 Caracterização das amostras de bio-óleos e frações aquosas por Espectrometria de Massas com transformada de Fourier (FT-MS);

A caracterização do bio-óleo por GC/MS é limitada em função do alto conteúdo de compostos oxigenados com baixa volatilidade [93]. Nesse sentido a Espectrometria de Massas com Transformada de *Fourier* (FT-MS) vem sendo utilizada para a caracterização dos componentes de bio-óleo considerando seu potencial para determinar compostos semi-voláteis e não voláteis, com alta massa molecular, obtendo informações parciais sobre suas estruturas [78,95]. Essa técnica atualmente é amplamente utilizada para analisar combustíveis fósseis e biocombustíveis, como petróleo e bio-óleos [96].

Em virtude da resolução e precisão de massa é possível atribuir a composição elementar ( $C_cH_hN_nO_oS_s$ ) a amostras de bio-óleos, agrupando-as em classes, número de carbono e DBE [94,95]. A DBE está diretamente relacionada a aromaticidades dos componentes presentes na amostra [94-97]:

A espectrometria de massas de íons negativos possuem grande capacidade de ionizar os compostos oxigenados no conteúdo dos bio-óleos. Sendo a fonte de ionização *electrospray* (ESI) a mais aplicada, promovendo uma ionização mais suave, onde os compostos contendo grupos hidroxila e ácidos carboxílicos, que são ionizados através do mecanismo de abstração de prótons ou desprotonação, gerando íons  $[M-H]$  [94,95].

Para a análise de espécies contendo nitrogênio em bio-óleos, trabalhos apontam que a espectrometria de massa de íons positivos utilizando *ESI* foi considerada a técnica mais adequada pois apresentam boa sensibilidade a carboidratos e compostos nitrogenados, não sendo possível detectar essas espécies através de outro método de ionização [95].

A fração aquosa inclui compostos oxigenados com até 10 átomos de oxigênio, com uma ampla variedade de ácidos e espécies  $N_{12}O_x$ , sendo a classe  $O_2$  geralmente mais abundante, e que aumentam a solubilidade em água de espécies ácidas nitrogenadas, ou seja, compostos contendo nitrogênio são solúveis apenas em função da presença de um grupo funcional oxigenado [98].

A fonte de ionização para caracterização por FT-MS será a ESI, utilizada para o bio-óleo o modo negativo *ESI* (-) e para as frações aquosas o modo positivo *ESI* (+).

#### 4.3.5.1. Caracterização dos Bio-óleos por *ESI*(-)-FTMS

Os resultados obtidos quanto ao número de íons detectados, atribuídos e não atribuídos para as amostras de bio-óleos são apresentados na Tabela 25. Quando a temperatura de pirólise passa de 500 °C para 600 °C o número de íons detectados diminui, isso pode estar associado a quebra dos constituintes da biomassa, que ocasiona uma maior formação de bio-gás, consequentemente não detectáveis através dessa técnica, uma vez que compreende o intervalo de massa entre 100 e 3000 *Da*.

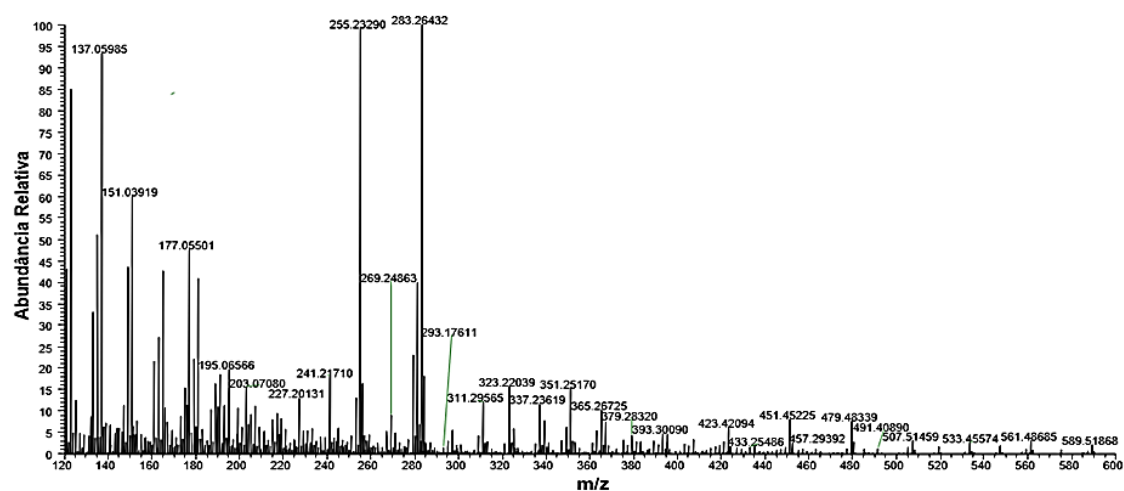
**Tabela 25.** Relação entre os íons identificados e atribuídos por FT-MS para bio-óleos.

	Bio-óleo 400 °C	Bio-óleo 500 °C	Bio-óleo 600 °C
<b>Detectados</b>	14649	15581	13243
<b>Atribuídos</b>	3730	3334	3341
<b>Não Atribuídos</b>	10919	12247	9902

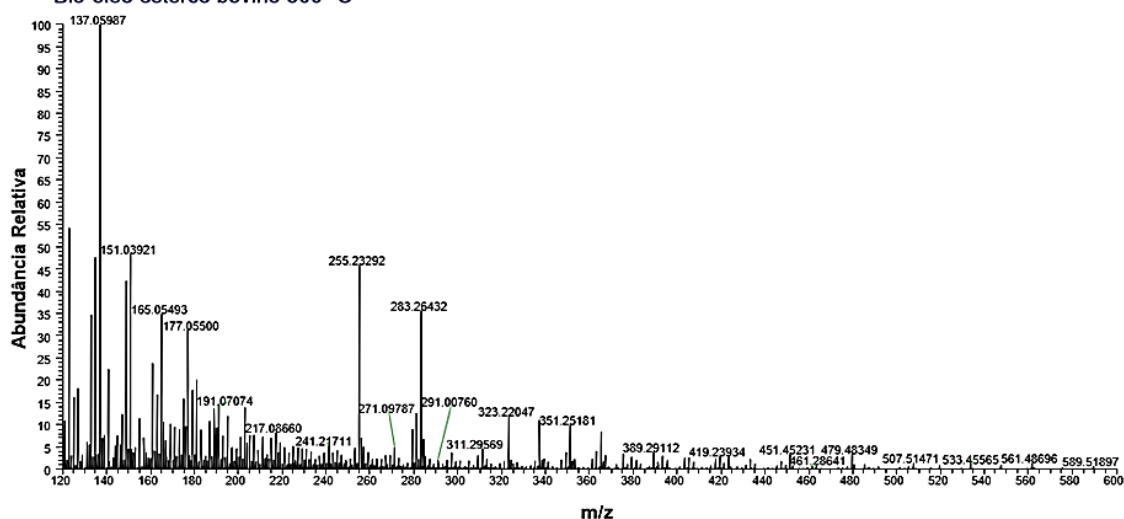
Os espectros de massas obtidos por *ESI*(-) na Figura 49 demonstram a distribuição majoritária dos compostos, à medida em que a temperatura de pirólise aumenta, se compararmos o bio-óleo 400 °C com valores entre 100-450 *Da*, e o bio-óleo a 600 °C ocorre uma diminuição do intervalo de distribuição dos compostos majoritários, situando-se entre 100-350 *Da*.

**Figura 49.** Espectro de massas obtidos por *ESI(-)*-FTMS para os bio-óleos.

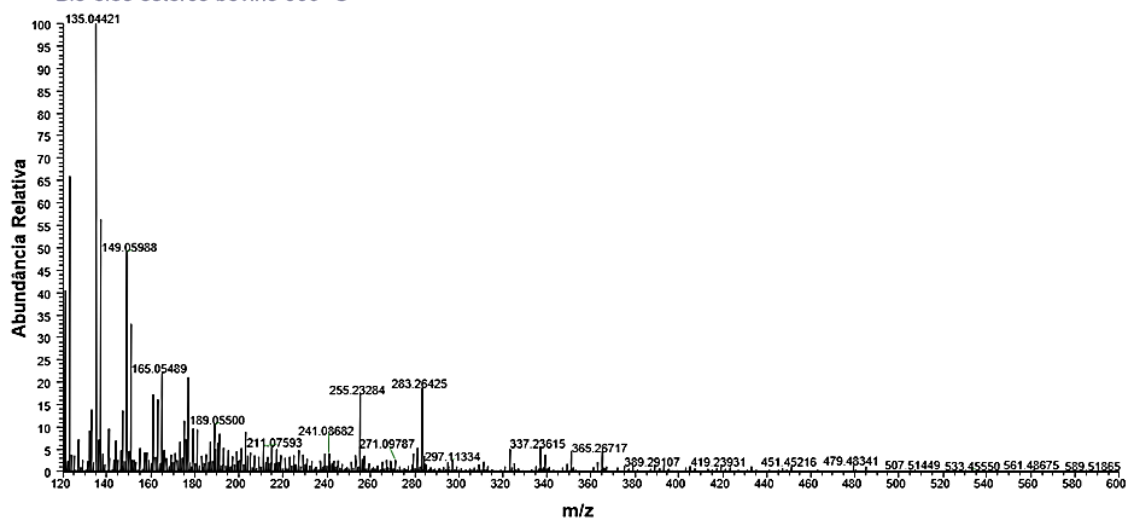
Bio-óleo esterco bovino 400 °C



Bio-óleo esterco bovino 500 °C



Bio-óleo esterco bovino 600 °C



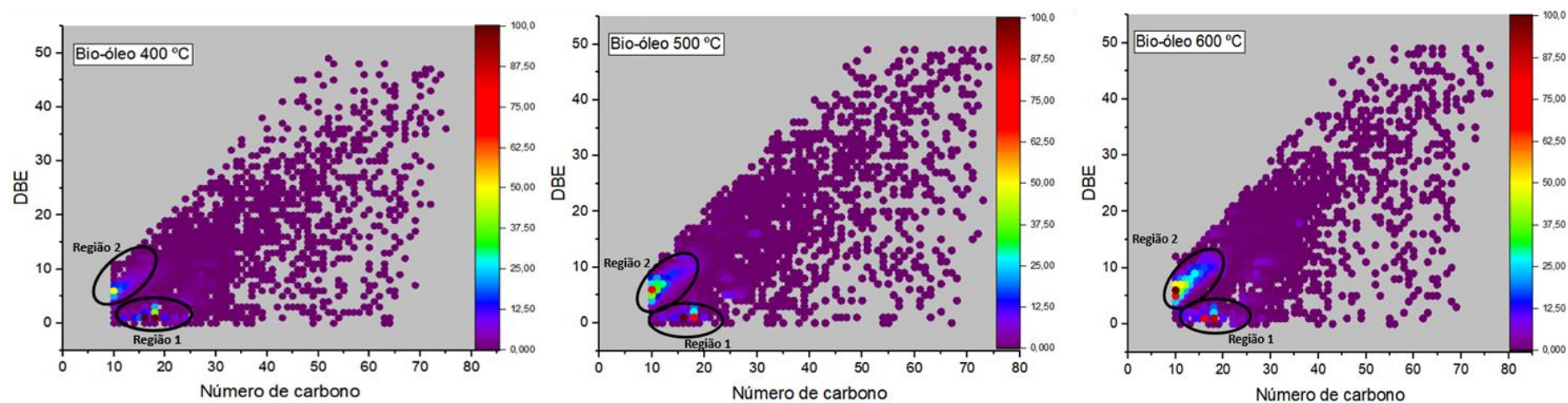


Os resultados indicam que em níveis de temperatura mais baixa os constituintes da biomassa são menos degradados [97]. Entretanto, a avaliação das mudanças em função da temperatura podem ser melhor evidenciadas pelo diagrama de distribuição de classes, onde foi possível observar a intensidade relativa, os valores de *DBE* e a variação em números de carbono para os compostos identificados.

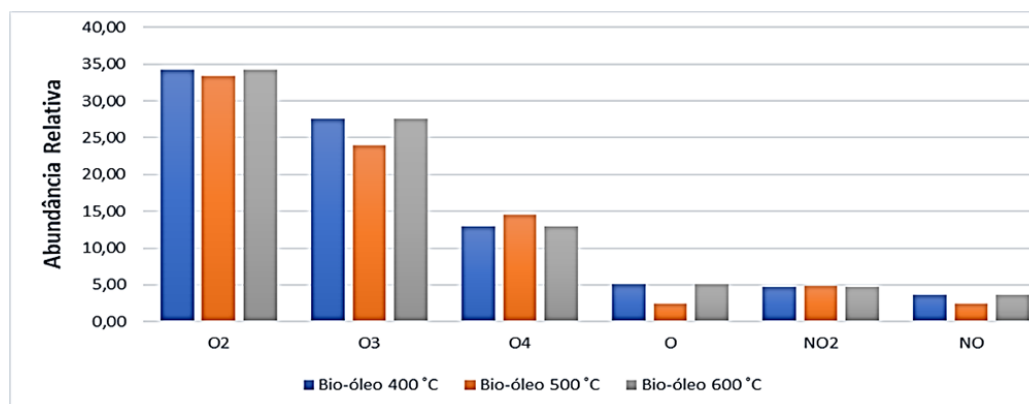
Os diagramas de distribuição de *DBE versus* a distribuição de número de carbono para os bio-óleos estão apresentados na figura 50. Os compostos apresentam a composição de 10 a 70 carbonos, sendo que a região de maior intensidade para o bio-óleo produzido a 400 °C está entre 15 e 20 átomos de carbono e *DBE* próxima a 1, e a segunda região de maior intensidade está situada entre 10 e 12 átomos de carbono com *DBE* entre 5 e 8.

À medida em que a temperatura de pirólise aumenta, foi possível observar que no bio-óleo à 500 °C ocorre uma redução da região 1 descrita anteriormente e aumento da região 2. Essa afirmação ganha destaque no bio-óleo produzindo a 600 °C, a região de maior intensidade está situada entre 10 e 12 átomos de carbono com *DBE* entre 5 e 8. Evidenciado que o aumento da temperatura resulta em quebra da biomassa lignocelulósica e o aumento aromaticidade dos compostos presentes. A Figura 51 apresenta o diagrama de distribuição de classes para os bio-óleos.

**Figura 50.** Diagramas de distribuição do DBE versus a distribuição do número de carbonos para os bio-óleos.



**Figura 51.** Distribuição de classes para os bio-óleos em *ESI*(-).

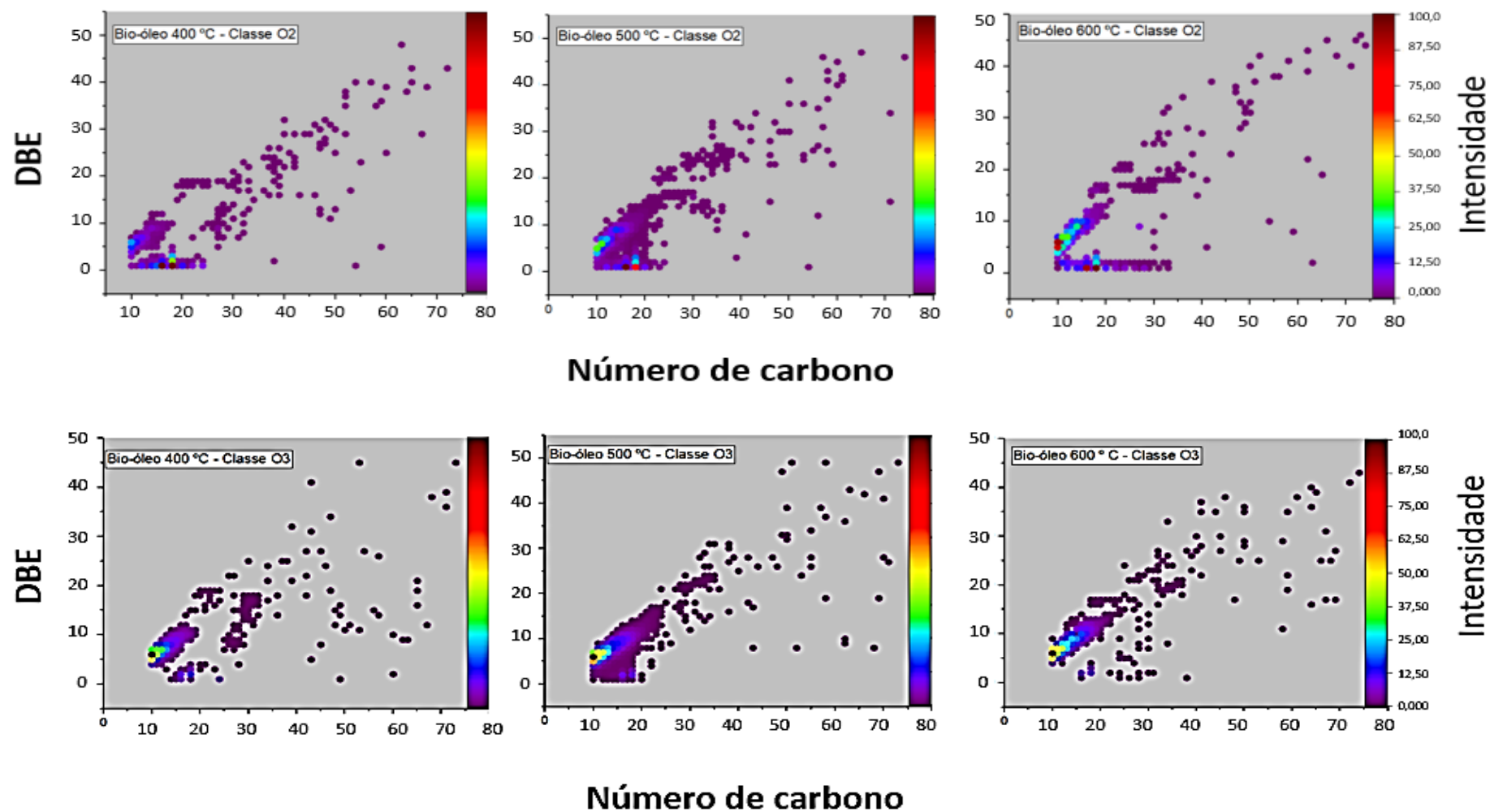


A Figura 52 representa as classes individuais presentes nas amostras de bio-óleos, que serão sempre em ordem crescente de temperatura, ou seja, a esquerda temos a classe  $O_2$  para o bio-óleos produzido a 400 °C, seguido pelo de 500 °C, finalizando com o de 600 °C.

A maior intensidade no bio-óleo a 400 °C está entre *DBE* 1-2 e número de carbono entre 18-20, a segunda região mais intensa está entre 10 e 12 átomos de carbono com *DBE* entre 5 e 8, ambas as amostras apresentam ácidos carboxílicos e fenóis, entretanto, os ácidos possuem maior intensidade, este resultado está de acordo com o obtido no GC/MS, sendo que este bio-óleo apresentou uma área relativa maior desses compostos, outro dado importante também é que o bio-óleo a 600 °C possui uma intensidade maior na região que indica a presença de compostos aromáticos, em especial os compostos fenólicos.

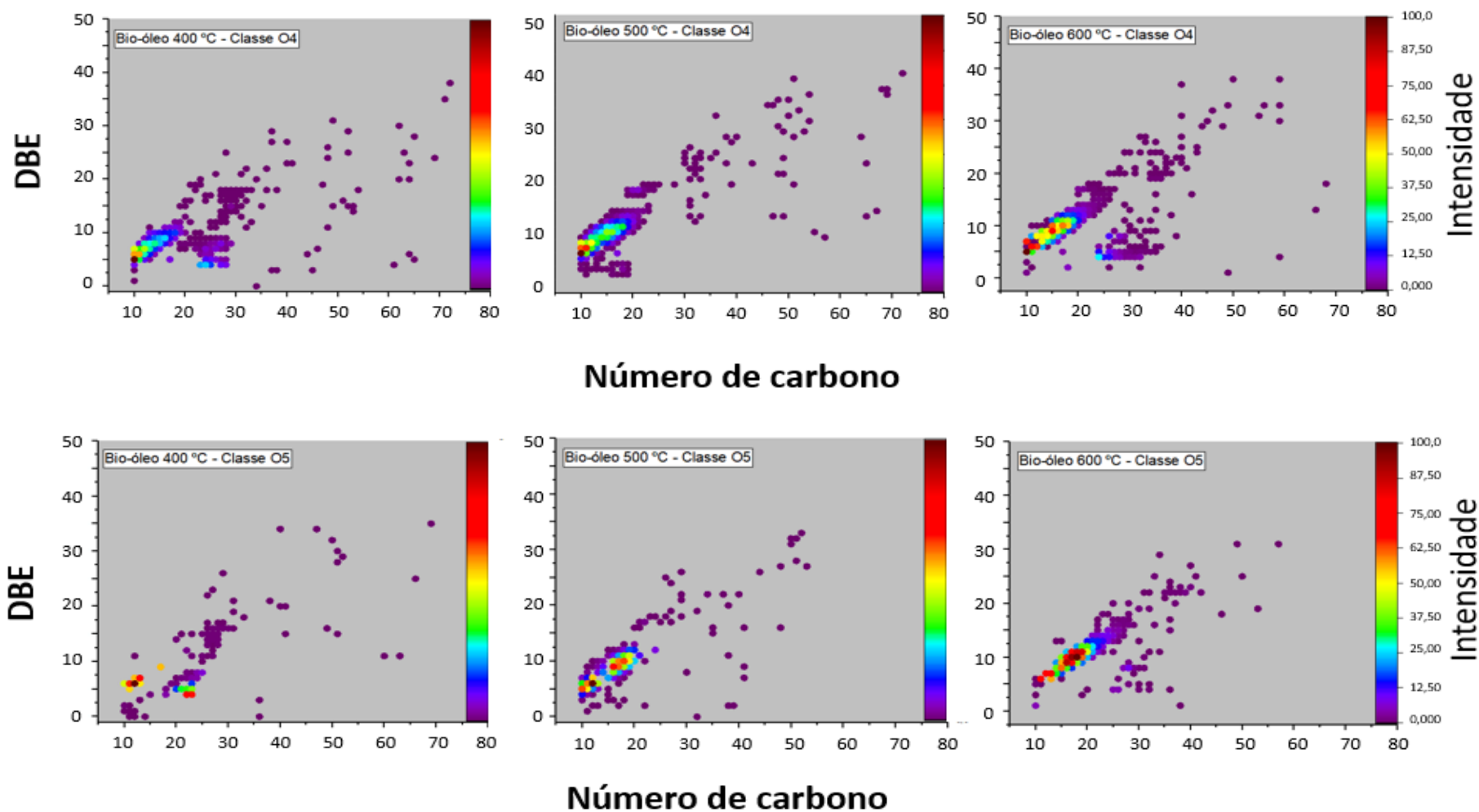
Ácidos carboxílicos são formados pela degradação dos componentes da biomassa e são conhecidos por suas propriedades corrosivas [37]. Alguns compostos de  $O_2$  com maior *DBE* (ou seja,  $DBE > 5$ ) também foram observados para ambas as amostras e correspondem a estruturas de compostos aromáticos. Os compostos mais abundantes nas classes  $O_3$  e  $O_4$  identificados com altos valores de *DBE* ( $DBE > 5$ ) são provavelmente derivados fenólicos [97].

**Figura 52.** Diagrama de classes presentes nas análises por *ESI* (-)-FTMS para os bio-óleos.



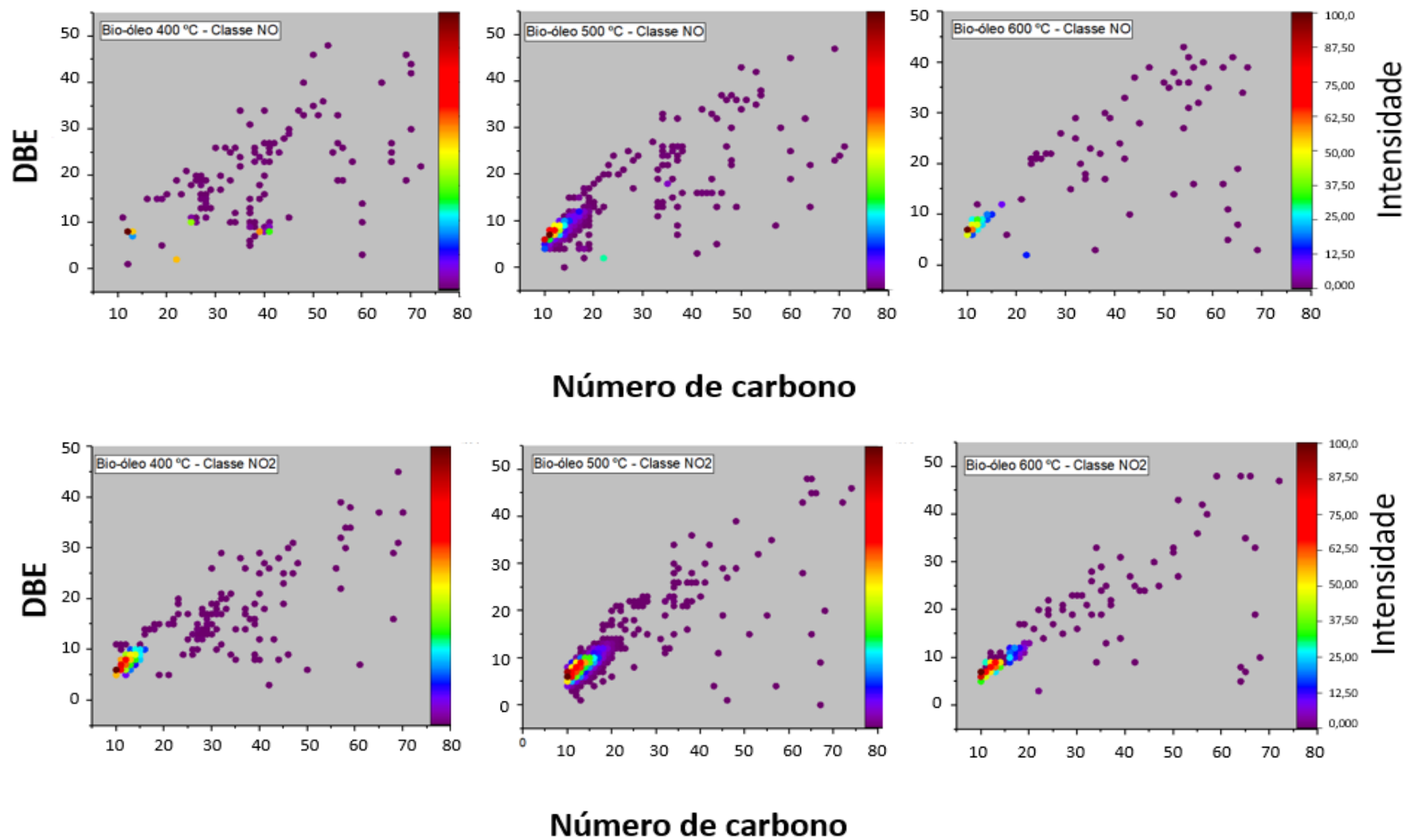
Continua...

Continuação da figura 52...



Continua...

Continuação da figura 52...



#### 4.3.5.2. Caracterização das frações aquosas por *ESI(+)*-FTMS

Os resultados obtidos quanto ao número de íons detectados, atribuídos e não atribuídos para as amostras de frações aquosas são apresentados na Tabela 26. A primeira evidência está relacionada a maior quantidade íons detectados e atribuídos para a fração aquosa produzida a 400 °C.

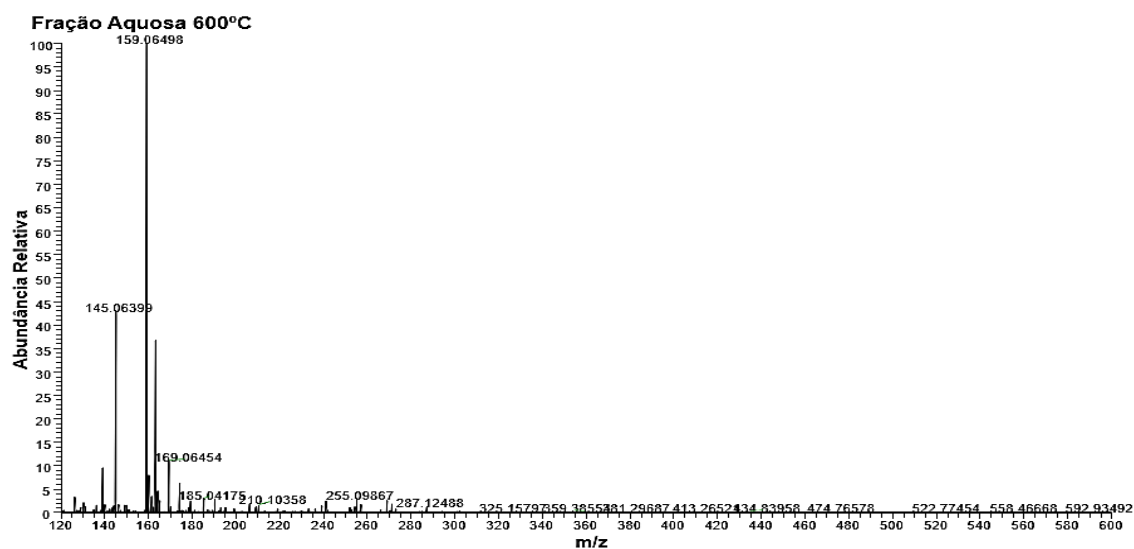
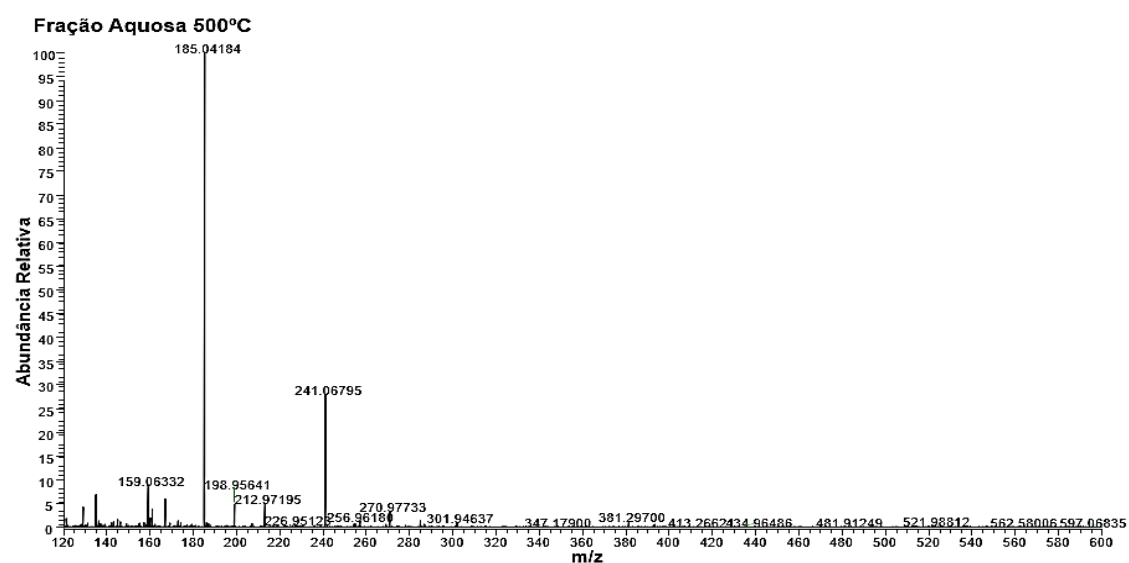
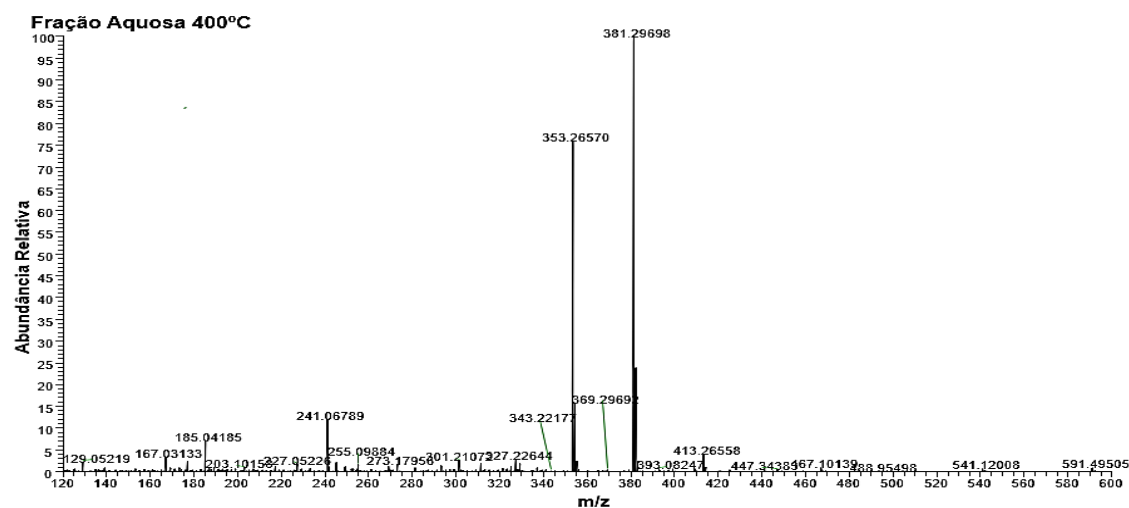
**Tabela 26.** Relação entre os íons detectados e atribuídos *ESI(+)* para a frações aquosas.

	Fração Aquosa 400 °C	Fração Aquosa 500 °C	Fração Aquosa 600 °C
<b>Detectados</b>	20287	9744	10275
<b>Atribuídos</b>	3823	568	1124
<b>Não Atribuídos</b>	16464	9176	9151

O modo negativo também foi avaliado, sendo que para a fração aquosa produzida a 500 e 600 °C maioria das classes encontradas foi de compostos oxigendos, porém *ESI(+)* se adequa melhor a análise da fração aquosa produzida a 400 °C e oferece embasamento para discussão da atividade antifúngica para esta fração. Isso foi possível através da análise dos espectros de massas obtidos por *ESI(-)*. Uma informação importante está relacionada a faixa de massa, para a fração 500 °C e 600 °C que vão de 100 a 500 *Da*, já a fração aquosa compreende uma faixa entre 100 e 650 *Da*, além disso, não forneceu ionização satisfatória das amostras a 500 °C e 600 °C.

O modo *ESI(+)* promove uma boa ionização da fração aquosa produzida a 400 °C, tornando os resultados em termos da atividade antifúngica mais claros. Nesse sentido fica evidente que as frações possuem composição diferente. E o espectro abrange um intervalo de razão *m/z* maior na análise da fração aquosa 400 °C. A Figura 53 apresenta os espectros de massas obtidos para as frações aquosas.

**Figura 53.** Espectro de massas obtidos por *ESI(+)*-FTMS para as frações aquosas.

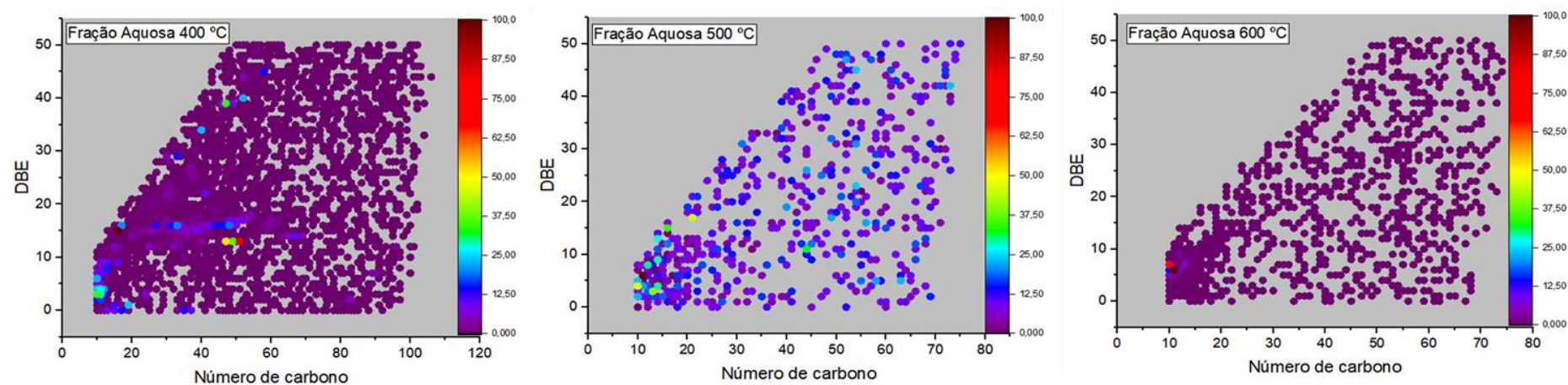




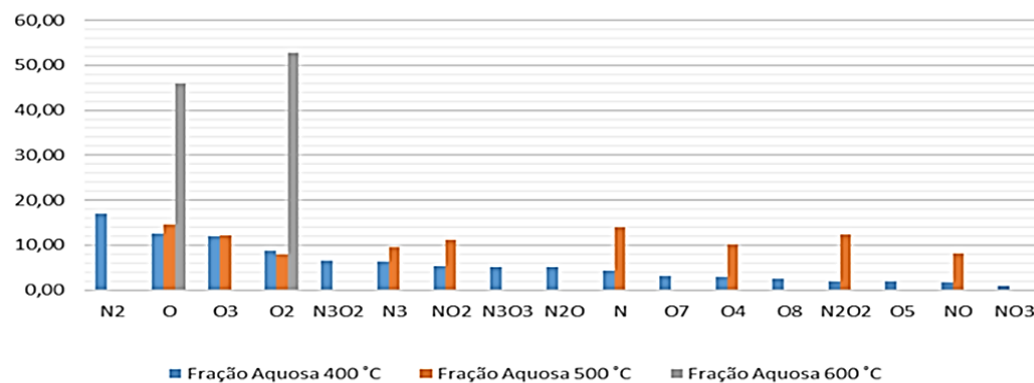
Para esse método de análise a fração aquosa a 400 °C apresentou compostos com altos números de carbono, entre 10 e 100, e *DBE* elevadas, indicando que são compostos de cadeia complexa e aromáticos, conforme podemos observar na Figura 54 as principais classes observadas para a fração aquosa a 400 °C são relacionadas a compostos nitrogenados de classes variáveis, para a fração aquosa a 500 °C ainda foi possível visualizar a presença destes compostos, porém em menor abundância relativa de intensidade, para a fração aquosa de 600 °C as classes encontradas foram apenas O e O<sub>2</sub>.

A Figura 55 apresenta a distribuição de classes para as frações aquosas e a Figura 56 diagramas de distribuição do *DBE versus* a distribuição do número de carbonos para as classes nitrogenadas das frações aquosas.

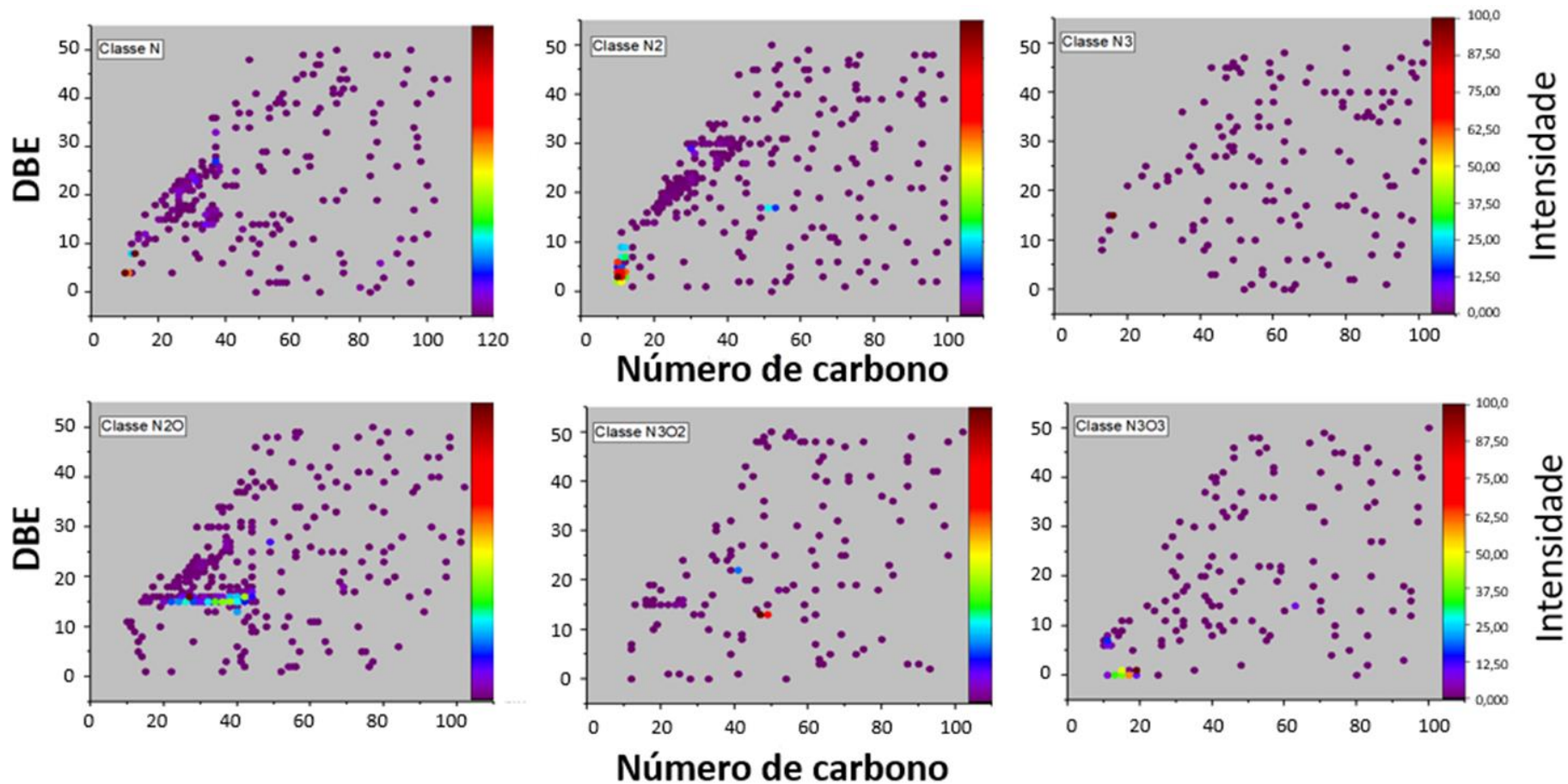
**Figura 54.** Diagramas de distribuição do *DBE* versus a distribuição do número de carbonos para as frações aquosas *ESI(+)*.



**Figura 55.** Distribuição de classes para as frações aquosas em *ESI(+)*.

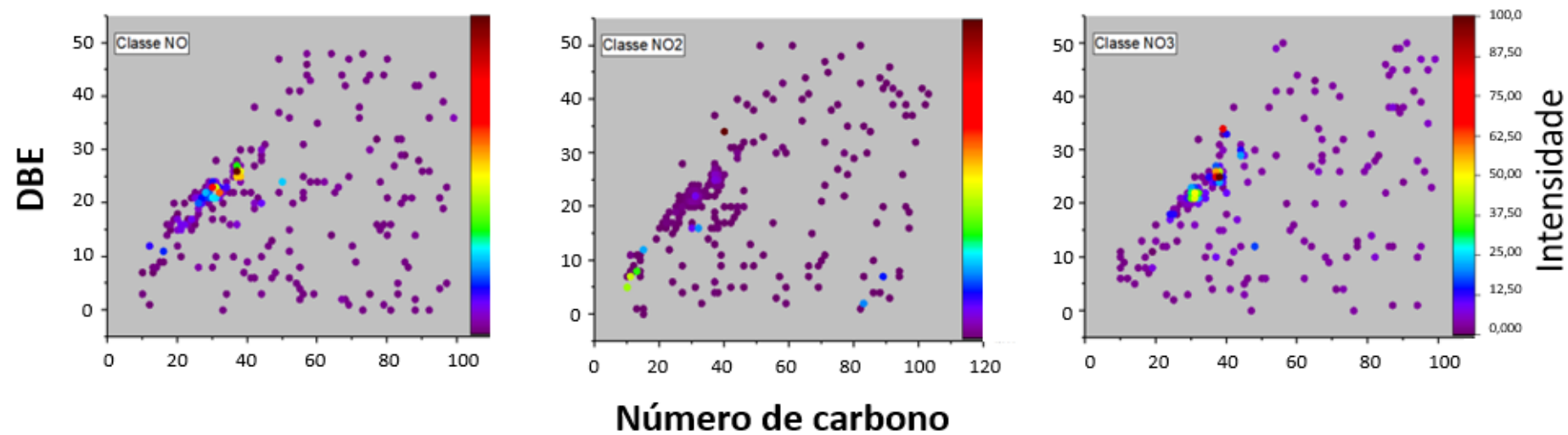


**Figura 56.** Diagramas de distribuição do DBE *versus* a distribuição do número de carbonos para as classes nitrogenadas das frações aquosas *ESI(+)*.



Continua...

Continuação da figura 56...



A presença de classes nitrogenadas nesta fração pode ser compreendida quando retomamos a definição de esterco bovino, que pode ser definido como uma excreção animal sendo rico em nitrogênio e fósforo. O nitrogênio está presente em suas formas orgânicas como aminoácidos e proteínas que não sofreram digestão, além disso, compostos fecais, urinários endógenos, secreções externas, produtos oriundos da fermentação no intestino grosso dos animais e também durante o acúmulo e armazenamento [99].

Os teores desses componentes variam de acordo com a raça, dieta animal e manejo. Podendo conter ainda resíduos de antibióticos que são destinados ao tratamento de doenças. A nutrição animal moderna através das tecnologias de processamento vem promovendo uma maior disponibilidade de subprodutos e alimentos alternativos, com nutrinetes mais prontamente disponíveis, visando a prevenção de doenças e promoção do crescimento, entretanto, os excessos desses nutrientes são excretados no esterco animal [99].

Outro ponto importante é que os pesticidas aplicados na agricultura nem sempre atingem apenas seus organismos-alvo, eles também podem ser dispersos através do solo, água e ar, sendo detectado em alimentos para consumo humano, acumulando em níveis elevados que são inaceitáveis no solo [100].

Um estudo sobre a análise de polifenóis e alcalóides em produtos à base de cacau por cromatografia líquida de ultra-alta performance e espectrometria de massas de alta resolução Orbitrap (UHPLC-Q-Orbitrap-MS/MS) descrito por Rodríguez-Carrasco *et al.* (2018) [98] revelou que classes de  $N_1O_x$  observada na fração aquosa da pirólise provavelmente eram derivados de pirrol, indol e carbazol com grupos funcionais oxigenados.

Os compostos aromáticos nitrogenados são amplamente conhecidos por seu potencial fungicida. O ciprodinil, a iprodiona e o tebuconazol são amplamente utilizados durante o cultivo de frutos de caroços. O ciprodinil [4-ciclopropil-6-metil-N-fenilpirimidina-2-amina] é um anilinopirimidídeo também com ação fungicida sistêmica e de amplo espectro [101].

A solubilidade em água de compostos nitrogenados aromáticos com alto valor de DBE e número de carbono é promovida pela presença de grupos funcionais oxigenados, como exemplo temos o carbazol que é pouco solúvel

em água devido a sua alta aromaticidade, porém em virtude da presença de grupos oxigenados pode ser detectado em água [98].

## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível avaliar a atividade antifúngica da fração líquida da pirólise de esterco bovino através da técnica de disco difusão, sendo evidenciado para os bio-óleos potencial fungistático em todas as temperaturas de pirólise e para as frações aquosas potencial fungistático em todas as temperaturas de pirólise e potencial fungicida para a fração aquosa produzida a 400 °C. Sendo considerados como fungicidas protetores em função da alta concentração das amostras utilizadas nas análises da atividade antifúngica.

Através da caracterização por GC/MS e FT-MS foi identificado compostos nitrogenados nas frações aquosas, esses compostos são provenientes da dieta animal, sendo que na menor temperatura de pirólise a concentração destes componentes foi maior, evidenciando uma diferença em termos de atividade antifúngica entre as frações aquosas produzidas, ou seja, a temperatura de pirólise tem influência na quebra dos constituintes da biomassa lignocelulósica e no potencial antifúngico das amostras em estudo.

A caracterização dos bio-óleos mostrou a presença de compostos oxigenados, sendo que os compostos fenólicos apresentaram a maior área percentual desses compostos e de acordo com os relatos da literatura estão associados a atividade antifúngica. O potencial fungistático observado para as temperaturas de pirólise foram relativamente próximos, indicando que a temperatura de pirólise não tem influência sobre a atividade antifúngica, este é exclusivamente da concentração dos compostos ativos presentes no bio-óleo.

Para além da utilização como biocombustível, através deste trabalho foi possível apresentar um novo viés de aplicação do produto líquido da pirólise de esterco bovino, que pode auxiliar no mecanismo de combate a resistência adquirida pelos fungos.

Neste sentido, a produção de fungicidas partindo de materiais mais baratos, que são subprodutos de uma atividade inerente a sobrevivência humana como a criação de gado, além de reduzir os impactos ambientais em função da reutilização dos resíduos, pode ainda auxiliar na redução de perdas econômicas ocasionadas pela deterioração de culturas das plantas em geral, cujo um dos principais agentes são os fungos fitopatogênicos.

## 6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

- Avaliar a atividade antifúngica dos bio-óleos e frações aquosas frente a outros fungos fitopatogênicos;
- Testar *in vivo* os bio-óleos e as frações aquosas em culturas;
- Avaliar resíduos de bio-óleos e frações aquosas no produto final.



## 7 REFERÊNCIAS

- [1] United Nations Department of Economic and Social Affairs Population Division. World Population Prospects The 2017 Revision Key Findings and Advance Tables. World Population Prospect 2017, 1–46, **2017**.
- [2] Dean, S. L.; Billingsley T.; Tobias, W. B.; Phippen, A. W.; Clayton, J. Gruver, Porras-Alfaro, A. A study of Glycine max (soybean) fungal communities under different agricultural practices. *Plant Gene* **2017**, 11, 8–16.
- [3] Oerke, E. C.; Dehne, H. W. Safeguarding production - Losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection* **2004**, 23 (4), 275-285.
- [4] Tscharntke,T.; Clough, Y.; Wanger, T. C.; Jackson, L.; Motzke, I.; Perfecto, I.; Vandermeer, J.; Whitbread, A. Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. *Biological Conservation* **2012**, 151 (1), 53–59.
- [5] Godfray, H. C. J.; Beddington, J. R.; Crute, I. R.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J. F.; Pretty, J.; Robinson, S.; Thomas, S. M.; Toulmin, C. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* **2010**, 327, 812-818.
- [6] Batt,C. A. Microbial Food Spoilage. *Science* **2016**, 1-3.
- [7] FAO, Global food losses and food waste - Extent, causes and prevention. Rome, **2011**. <http://www.fao.org/3/a-i2697e.pdf> (acesso em 22 de janeiro de 2019).
- [8] Benítez, R. O. Perdas e desperdícios de alimentos na América Latina e no Caribe, **2016**. <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/pt/c/239394/> (acesso em 22 de janeiro de 2019).

- [9] Oliveira, C. M.; Auad, A. M.; Mendes, S. M.; Frizzas, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Protection* **2014**, 56, 50–54.
- [10] Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Projeções do agronegócio: Brasil 2016/17 a 2026/27. Brasília – DF, **2017**.
- [11] Kreyci, P. F.; Menten, J. O. Limitadoras de produtividade. *Cultivar Caderno Técnico* **2013**, 167, 1–12.
- [12] Ghorbanpour, M.; Omidvari, M.; Abbaszadeh-Dahaji, P.; Omidvar, R.; Kariman, K. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. *Biological Control* **2018**, 117, 147–157.
- [13] Vidhyasekaran, P. *Concise Encyclopedia of Plant Pathology*, **2004**.
- [14] Kong, J.; Xie, Y. F.; Guo, Y. H.; Cheng, Y. L.; Qian, H.; Yao, W. R. Biocontrol of postharvest fungal decay of tomatoes with a combination of thymol and salicylic acid screening from 11 natural agents. *Food Science and Technology* **2016**, 72, 215–222,.
- [15] Boubaker, H.; Karim, H.; El Hamdaoui, A.; Msanda, F.; Leach, D.; Bombarda, I.; Vanloot, P.; Abbad, A.; Boudyach, E. H. Ait Ben Aoumar, A., Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. *Industrial Crops and Products* **2016**, 86, 95–101.
- [16] Choi, N. H.; Jang, J. Y.; Choi, G. J. Choi, Y. H. Jang, K. S. Nguyen, V. T. Min, B. S. Le Dang, Q. Kim, J. C. Antifungal activity of sterols and dipsacus saponins isolated from *Dipsacus asper* roots against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2017**, 141, 103–108.
- [17] Martínez, G.; Regente, M.; Jacobi, S.; Del Rio, M.; Pinedo, M.; de la Canal, L. Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2017**, 140, 30–35.

- [18] Budagavi, D. P.; Zarin, S.; Chugh, A. Antifungal activity of Latacin 1 derived cell-penetrating peptides against *Fusarium solani*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2018**, 1860 (2), 250–256.
- [19] El Ouadi, Y.; Manssouri, M.; Bouyanzer, A.; Majidi, L.; Bendaif, H.; Elmsellem, H.; Shariati, M. A.; Melhaoui, A.; Hammouti, B. Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Microbial Pathogenesis* **2017**, 107, 321–326.
- [20] Srivastava, S.; Kadooka, C.; Uchida, J. Y. *Fusarium* species as pathogen on orchids. *Microbiological Research* **2018**, 207, 188–195.
- [21] Ben Amira, M.; Lopez, D.; Triki Mohamed, A.; Khouaja, A.; Chaar, H.; Fumanal, B.; Gousset-Dupont, A.; Bonhomme, L.; Label, P.; Goupil, P.; Ribeiro, S.; Pujade-Renaud, V.; Julien, J. L.; Auguin, D.; Venisse, J. S. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biological Control* **2017**, 110, 70–78.
- [22] Mansfield, J.; Genin, S.; Magori, S.; Citovsky, V.; Sriariyanum, M.; Ronald, P.; Dow, M. Verdier, V. Beer, S. V.; Machado, M. A.; Toth, I.; Salmond, G.; Foster, G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **2012**, 13 (6), 614–629.
- [23] Omar, N. H.; Mohd, M.; Mohamed Nor, N. M. I.; Zakaria, L. Characterization and pathogenicity of *Fusarium* species associated with leaf spot of mango (*Mangifera indica* L.). *Microbial Pathogenesis* **2018**, 114, 362–368.
- [24] Leslie, J. F.; Summerell, B. A. *The Fusarium Laboratory Manual* Blackwell. *The Fusarium Laboratory Manual* **2006**, 1, 388.
- [25] Trabelsi, I.; Oves, D.; Manteca, A.; Genilloud, O.; Altalhi, A.; Nour, M. Antimicrobial Activities of Some Actinomycetes Isolated from Different Rhizospheric Soils in Tunisia. *Current Microbiology* **2016**, 73 (2), 220–227.

- [26] De la Lastra, E.; Basallote-Ureba, M. J.; De los Santos, B.; Miranda, L.; Vela-Delgado, M. D.; Capote, N. A TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for accurate detection and quantification of *Fusarium solani* in strawberry plants and soil. *Scientia Horticulturae* **2018**, 237, 128–134.
- [27] Toghueo, R. M. K.; Eke, P.; Zabalgogezcoa, Í.; de Aldana, B. R. V.; Nana, L. W.; Boyom, F. F. Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control* **2016**, 96, 8–20.
- [28] Mayr, U.; Rasch, S.; Schmid, R. M.; Huber, W.; Lahmer, T. First description of spontaneous fungal peritonitis caused by *Fusarium solani* in a critically ill patient with liver cirrhosis. *New Microbes New Infect.* **2017**, 20, 16–17.
- [29] Borges, D. P.; Santos, A. W. A.; Magalhaes, S. M. M.; Sidrim, J. J.; Rocha, M. F. G. *Fusarium solani* infection as an initial manifestation of AML transformation in myelodysplastic syndrome: A case report. *Journal de Mycologie Médicale* **2018**, 28, 390–392.
- [30] Shigeyasu, C.; Yamada, M.; Aoki, K.; Ishii, Y. Metagenomic analysis for detecting *Fusarium solani* in a case of fungal keratitis. *Journal of Infection and Chemotherapy* **2018**, 24 (8), 664–668.
- [31] Ji, C. Y.; Chen, C. J.; Wang, X. R.; Liu, Y.; Liu, J. Y.; Zeng, B. S. A report on canker disease of *Falcataria moluccana* caused by *Lasiodiplodia theobromae* in China. *Crop Protection* **2017**, 91, 89–92.
- [32] Burgess, T. I.; Barber, P. A.; Mohali, S.; Pegg, G.; de Beer, W.; Wingfield, M. J. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* **2006**, 98 (3), 423–435.

- [33] Netto, M. S. B.; Lima, W. G.; Correia, K. C.; da Silva, C. F.B.; Thon, M.; Martins, R. B.; Miller, R. N. G.; Michereff, S. J.; Câmara, M. P.S. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Biology* **2017**, 121 (4), 437–451.
- [34] Mohali, S.; Slippers, B.; Wingfield, M. Identification of Botryosphaeriaceae from *Eucalyptus*, *Acacia* and *Pinus* in Venezuela. *Fungal Diversity* **2007**, 25, 103–125.
- [35] Marques, M. W.; Lima, N. B.; de Moraes, M. A.; Barbosa, M. A. G.; Souza, B. O.; Michereff, S. J.; Phillips, A. J. L.; Câmara, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* **2013**, 61(1), 181–193.
- [36] Alves, M. F.; Castro Nizio, D. A.; Sampaio, T. S.; Nascimento, A. F.; Brito, F. A.; Melo, J. O.; Arrigoni-Blank, M. F.; Gagliardi, P. R.; Machado, S. M. F.; Blank, A. F. *Myrcia lundiana* Kiaersk native populations have different essential oil composition and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. *Industrial Crops and Products*. **2016**, 85, 266–273.
- [37] Cysne, A. Q.; Cardoso, J. E.; Maia, A. de H. N.; Farias, F. C. Spatial-temporal analysis of gummosis in three cashew clones at northeastern Brazil. *Journal of Phytopathology* **2010**, 158(10), 676–682.
- [38] Freire, F. C. O.; Cardoso, J. E.; dos Santos, A. A.; Viana, F. M. P. Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. *Crop Protection* **2002**, 21 (6), 489–494.
- [39] Moreira, R. C.; Lima, J. S.; Silva, L. G. C.; Cardoso, J. E. Resistance to gummosis in wild cashew genotypes in northern Brazil. *Crop Protection* **2013**, 52, 10–13.
- [40] Brito, E. S.; de Araújo, M. C. P.; Lin, L. Z.; Harnly, J. Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry* **2007**, 105 (3), 1112–1118.

- [41] Ogunwolu, S. O.; Henshaw, F. O.; Mock, H. P.; Santros, A.; Awonorin, S. O. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. *Food Chemistry* **2009**, 115 (3), 852–858.
- [42] Cipriano, A. K. A. L.; Gondim, D. M. F.; Vasconcelos, I. M.; Martins, J. A. M.; Moura, A. A.; Moreno, F. B.; Monteiro-Moreira, A. C. O.; Melo, J. G. M.; Cardoso, J. E.; Paiva, A. L. S. Oliveira, J. T. A. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. *Journal of Proteomics* **2015**, 113, 90–109.
- [43] Muniz, C. R.; Freire, F. C. O.; Viana, F. M. P.; Cardoso, J. E.; Sousa, C. A. F.; Guedes, M. I. F.; van der Schoor, R.; Jalink, H. Monitoring cashew seedlings during interactions with the fungus *Lasiodiplodia theobromae* using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynthetica* **2014**, 52 (4), 529–537.
- [44] Peixinho, G. de S.; Ribeiro, V. G.; Amorim, E. P. da R. Controle da Podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos de videira cv. Itália por óleos essenciais e quitosana. *Summa Phytopathol* **2017**, 43 (1), 26–31.
- [45] Maftoonazad, N.; Ramaswamy, H. S.; Moalemiyan, M.; Kushalappa, A. C. Effect of pectin-based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection. *Carbohydrate. Polymers* **2007**, 68 (2), 341–349.
- [46] Ji, C. Y.; Chen, C. J.; Wang, X. R.; Liu, Y.; Liu, J. Y.; Zeng, B. S. A report on canker disease of *Falcataria moluccana* caused by *Lasiodiplodia theobromae* in China. *Crop Protection* **2017**, 91, 89–92.
- [47] Rodríguez-Gálvez, E.; Guerrero, P.; Barradas, C.; Crous, P. W.; Alves, A. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology* **2017**, 121 (4), 452–465.

- [48] Sajitha, K. L.; Maria Florence, E. J.; Dev, S. A. Screening of bacterial biocontrols against sapstain fungus (*Lasiodiplodia theobromae* Pat.) of rubberwood (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.). *Research in Microbiology* **2014**, 165 (7), 541–548.
- [49] Papacostas, L. J.; Henderson, A.; Choong, K.; Sowden, D. An unusual skin lesion caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Medical Mycology Case Reports* **2015**, 8, 44–46.
- [50] Donnio, A.; Desbois, N.; Boiron, P.; Théodose, R.; Mouniee, D.; Thoumazet, F.; Merle, H. Kératomycose et endophtalmie d'étiologie exceptionnelle : *Lasiodiplodia theobromae*. *Journal Français d'Ophtalmologie* **2006**, 29 (2), 196.
- [51] Guedes, R. E.; Luna, A. S.; Torres, A. R. Operating parameters for bio-oil production in biomass pyrolysis: A review. *Journal of analytical and applied pyrolysis* **2017**, 129, 134–149.
- [52] Sharma R.; Sheth, P. N. Thermo-Chemical Conversion of Jatropha Deoiled Cake: Pyrolysis vs. Gasification. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* **2015**, 6 (5), 376–380.
- [53] Zhao, N.; Li, B. X. The effect of sodium chloride on the pyrolysis of rice husk. *Applied Energy* **2016**, 178, 346–352.
- [54] García, R.; Pizarro, C.; Lavín, A. G.; Bueno, J. L. Biomass sources for thermal conversion. Techno-economical overview. *Fuel* **2017**, 195, 182–189.
- [55] Singh, Y. D.; Mahanta, P.; Bora, U. Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy production. *Renewable Energy* **2017**, 103, 490–500.
- [56] Vieira, G. E. G.; Nunes, A. P.; Teixeira, L. F. ; Colen, A. G. N. Biomassa : uma visão dos processos de pirólise. *Revista Liberato* **2014**, 15 (24), 167-177.

- [57] Caprariis, B.; de Filippis, P.; Petrullo, A.; Scarsella, M. Hydrothermal liquefaction of biomass: Influence of temperature and biomass composition on the bio-oil production. *Fuel* **2017**, 208, 618–625.
- [58] Wang, S.; Dai, G.; Yang, H.; Luo, Z. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. *Progress in Energy and Combustion Science* **2017**, 62, 33–86.
- [59] Xin, Y.; Cao, H.; Yuan, Q.; Wang, D. Two-step gasification of cattle manure for hydrogen-rich gas production: Effect of biochar preparation temperature and gasification temperature. *Waste Management* **2017**, 68, 618–625.
- [60] Shahzadi, T.; Mehmood, S.; Irshad, M.; Anwar, Z.; Afroz, A.; Zeeshan, N.; Rashid, U.; Sughra, K. Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. *Advances Bioscience and Biotechnology* **2014**, 05 (3), 246–251.
- [61] Yu, J.; Paterson, N.; Blamey, J.; Millan, M. Cellulose, xylan and lignin interactions during pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Fuel* **2017**, 191, 140–149.
- [62] Dhyani, V.; Bhaskar, T. A comprehensive review on the pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Renewable Energy* **2017**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.035>.
- [63] Makarfi Isa Y.; Ganda, E. T. Bio-oil as a potential source of petroleum range fuels. *Renewable Sustainable Energy Reviews* **2018**, 81, 69–75.
- [64] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Perspectivas Agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira. Perspect. Agrícolas 2015-2024. 1–54, **2015**.
- [65] Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasil 2016/2017 a 2026/2017. Projeções de Longo Prazo, **2017**.



- [66] Xin, Y.; Wang, D.; Li, X. Q.; Yuan, Q.; Cao, H. Influence of moisture content on cattle manure char properties and its potential for hydrogen rich gas production. *Journal of analytical and applied pyrolysis* **2018**, 1, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.01.005>.
- [67] Kim, K. H.; Jeong, H. S.; Kim, J. Y.; Han, G. S.; Choi, I. G.; Choi, J. W. Evaluation of the antifungal effects of bio-oil prepared with lignocellulosic biomass using fast pyrolysis technology. *Chemosphere* **2012**, 89 (6), 688–693.
- [68] Santana, K. V. R. Conversão Termoquímica de Esterco Bovino em Micro e Macroescala com Vistas a Obtenção de Biocombustíveis e Produtos da Química Fina. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe, **2017**.
- [69] Bedmutha, R.; Booker, C. J.; Ferrante, L.; Briens, C.; Berruti, F.; Yeung, K. K. C.; Scott, I.; Conn, K. Insecticidal and bactericidal characteristics of the bio-oil from the fast pyrolysis of coffee grounds. *Journal of analytical and applied pyrolysis* **2011**, 90 (2), 224–231.
- [70] Okutucu, C.; Duman, G.; Ucar, S.; Yasa, I.; Yanik, J. Production of fungicidal oil and activated carbon from pistachio shell. *Journal of analytical and applied pyrolysis* **2011**, 91 (1), 140–146.
- [71] Lourençon, T. V.; Mattos, B. D.; Cademartori, P. H. G.; Magalhães, W. L. E. Bio-oil from a fast pyrolysis pilot plant as antifungal and hydrophobic agent for wood preservation. *Journal of analytical and applied pyrolysis* **2016**, 122, 1–6.
- [72] Nascimento, P. F. C.; Nascimento, A. C.; Rodrigues, C. S.; Antonioli, A. R.; Santos, P. O.; Júnior, A. M. B.; Trindade, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: Uma abordagem multifatorial dos métodos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2007**, 17(1), 108–113. Doi: 10.1590/S0102-695X2007000100020.

- [73] Li, Y.; Wu, C.; Wu, T.; Wang, L.; Chen, S.; Ding, T.; Hu, Y. Preparation and characterization of citrus essential oils loaded in chitosan microcapsules by using different emulsifiers. *Journal of Food Engineering* **2018**, 217, 108–114.
- [74] Nascimento, P. F. C.; Nascimento, A. C.; Rodrigues, C. S.; Antonioli, A. R.; Santos, P. O.; Júnior, A. M. B.; Trindade, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: Uma abordagem multifatorial dos métodos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2007**, 17(1), 108-113.
- [75] Laviniki, V. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de canela da China (*Cinnamomun cassia*), orégano (*Origamun vulgare*), pimenta negra (*Piper nigrum*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*) frente à amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2013**.
- [76] Barboza, H. T. G.; Soares, A. G.; De, M. J.; Fonseca, O.; Batista, J.; Inez, M.; Saquis, de M. Avaliação da Ação Fungicida de Novas Dialquilfosforilidrazonas Sintetizadas para Cultura de Mamão ( *Carica Papaya*L.) 4–7, 2007.
- [77] Carregosa, I. S.C. Termovalorização da biomassa de aguapé (*Eichhornia crassipes*) através de pirólise em reator forno rotativo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe, **2016**.
- [78] Kim, S. J.; Jung, S. H.; Kim, J. S. Fast pyrolysis of palm kernel shells: Influence of operation parameters on the bio-oil yield and the yield of phenol and phenolic compounds. *Bioresource Technology* **2010**, 101 (23), 9294-9300.
- [79] Ateş, F.; Işıkdag, M. A. Evaluation of the role of the pyrolysis temperature in straw biomass samples and characterization of the oils by GC/MS. *Energy and Fuels* **2008**, 22 (3). doi: 10.1021/ef7006276.
- [80] Funda, A.; Müjde, A. I. Evaluation of the role of the pyrolysis temperature in straw biomass samples and characterization of the oils by GC/MS. *Energy Fuels* **2008**, 2 (3), 1936–1943.

- [81] Oshiro, C. R. O esterco bovino como biomassa alternativa para produção de energia em cooperativa agroindustrial paranaense. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, **2015**.
- [82] Ribeiro, M. G.; Filho, A. S. de C.; Listoni, F. J. P. Dimetilsulfóxido - DMSO no teste de sensibilidade microbiana in vitro em cepas de *Rhodococcus equi* isoladas de afecções pulmonares em potros. *Ciência Rural* **2001**, 31 (5), 889–892.
- [83] Schroeder, P.; do Nascimento, B. P.; Romeiro, G. A.; Figueiredo, M. K. K.; Veloso, M. C. da C. Chemical and physical analysis of the liquid fractions from soursop seed cake obtained using slow pyrolysis conditions. *Journal of analytical and applied pyrolysis* **2017**, 124, 161-174. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2017.02.010>.
- [84] Santos, L. A.; Marek, J.; Werner, L. C.; Mariano, L. C.; Duarte, M.; Faria, R. Sensibilidade micelial in vitro de cercospora beticola ao oxiclreto de cobre mycelial sensitivity of cercospora beticola to copper oxychloride. *Scientia Agraria Paranaensis* **2017**, 16 (1), 153–157.
- [85] Zhang, K.; Zhou, L.; Brady, M.; Xu, F.; Yu, J.; Wang, D. Fast analysis of high heating value and elemental compositions of sorghum biomass using near-infrared spectroscopy. *Energy* **2017**, 118, 1353-1360.
- [86] Elkasabi, Y.; Mullen, C. A.; Jackson, M. A.; Boateng, A. A. Characterization of fast-pyrolysis bio-oil distillation residues and their potential applications. *Journal of analytical and applied pyrolysis* **2015**, 114, 179-186.
- [87] Cao, H.; Xin, Y.; Wang, D.; Yuan, Q. Pyrolysis characteristics of cattle manures using a discrete distributed activation energy model. *Bioresource Technology* **2014**, 172, 219-225.

- [88] Nizio, D. A. de C.; Brito, F. de A.; Sampaio, T. S.; Melo, J. de O.; Silva, F. L. S.; Gagliardi, P. R.; Arrigoni-Blank, M. de F.; Anjos, C. S.; Alves, P. B.; Wisniewski, A.; Blank, A. F. Chemical diversity of native populations of *Varronia curassavica* Jacq. and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. *Industrial Crops Products* **2015**, 76, 437–448.
- [89] Sánchez, M. E.; Menéndez, J. A.; Domínguez, A.; Pis, J. J.; Martínez, O.; Calvo, L. F.; Bernad, P. L. Effect of pyrolysis temperature on the composition of the oils obtained from sewage sludge. *Biomass and Bioenergy* **2009**, 33, 933-940.
- [90] Pacheco, S. M. V.; Damasio, F. Vanilina: Origem, Propriedades e Produção. *Química Nova na Escola* **2010**, 32 (4), 215–219.
- [91] Mohan, D.; Shi, J.; Nicholas, D. D.; Pittman, C. U.; Steele, P. H.; Cooper, J. E. Fungicidal values of bio-oils and their lignin-rich fractions obtained from wood/bark fast pyrolysis. *Chemosphere* **2008**, 71 (3), 456–465.
- [92] Zabka, M.; Pavela, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* **2013**, 93, 1051-1056.
- [93] Tessarolo, N. S.; Silva, R. C.; Vanini, G.; Pinho, A.; Romão, W.; Castro, E. V. R.; Azevedo, D. A. Assessing the chemical composition of bio-oils using FT-ICR mass spectrometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Microchemical Journal* **2014**, 117, 68–76.
- [94] Crepier, J.; Le, A.; Charon, N.; Albrieux, F.; Duchene, P.; Heinisch, S. Ultra-high performance supercritical fluid chromatography hyphenated to atmospheric pressure chemical ionization high resolution mass spectrometry for the characterization of fast pyrolysis bio-oils. *Journal of Chromatography B* **2018**, 1086, 38–46.

- [95] Staš, M.; Chudoba, J.; Auersvald, M.; Kubička, D.; Conrad, S.; Schulzke, T.; Pospíšil, M. Application of orbitrap mass spectrometry for analysis of model bio-oil compounds and fast pyrolysis bio-oils from different biomass sources. *Journal of analytical and applied pyrolysis* **2017** 124, 230–238.
- [96] Wang, W.; Dong, M.; Song, C.; Cai, X.; Liu, Y.; Liu, Z.; Tian, S. Structural information of asphaltenes derived from petroleum vacuum residue and its hydrotreated product obtained by FT-ICR mass spectrometry with narrow ion isolation windows. *Fuel* **2018**, 227, 111–117.
- [97] Tessarolo, N. S.; Silva, R. V. S.; Vanini, G.; Casilli, A.; Ximenes, V. L.; Mendes, F. L.; Rezende, A.; Romão, W.; Castro, E. V. R.; Kaiser, C. R.; Azevedo, D. A. Characterization of thermal and catalytic pyrolysis bio-oils by high-resolution techniques:  $^1\text{H}$  NMR, GC  $\times$  GC-TOFMS and FT-ICR MS. *Journal of analytical and applied pyrolysis* **2016**, 117, 257–267.
- [98] Rodríguez-carrasco, Y.; Gaspari, A.; Graziani, G.; Santini, A.; Ritieni, A. Fast analysis of polyphenols and alkaloids in cocoa-based products by ultra- high performance liquid chromatography and Orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap-MS / MS). *Food Research International* **2018**, 111, 229–236.
- [99] He, Z.; Pagliari, P. H.; Waldrip, H. M. Applied and Environmental Chemistry of Animal Manure: A Review. *Pedosphere* **2016**, 26 (6), 779–816.
- [100] Morillo, E.; Villaverde, J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of the Total Environment* **2017**, 586, 576–597.
- [101] Calvo, H.; Redondo, D.; Remón, S.; Venturini, M. E.; Arias, E. Efficacy of electrolyzed water, chlorine dioxide and photocatalysis for disinfection and removal of pesticide residues from stone fruit. *Postharvest Biology and Technology* **2019**, 148, 22–31.